

**Einfluß von Basensubstitutionen in der
Anticodon-Region
auf die Aktivität der Phenylalanin-spezifischen
Transfer-Ribonukleinsäure aus Hefe**

Hans-Georg Schleich

1977

Einfluß von Basensubstitutionen in der Anticodon-
Region auf die Aktivität der Phenylalanin-spezi-
fischen Transfer-Ribonukleinsäure
aus Hefe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Hans-Georg Schleich
aus Heidelberg

München 1977



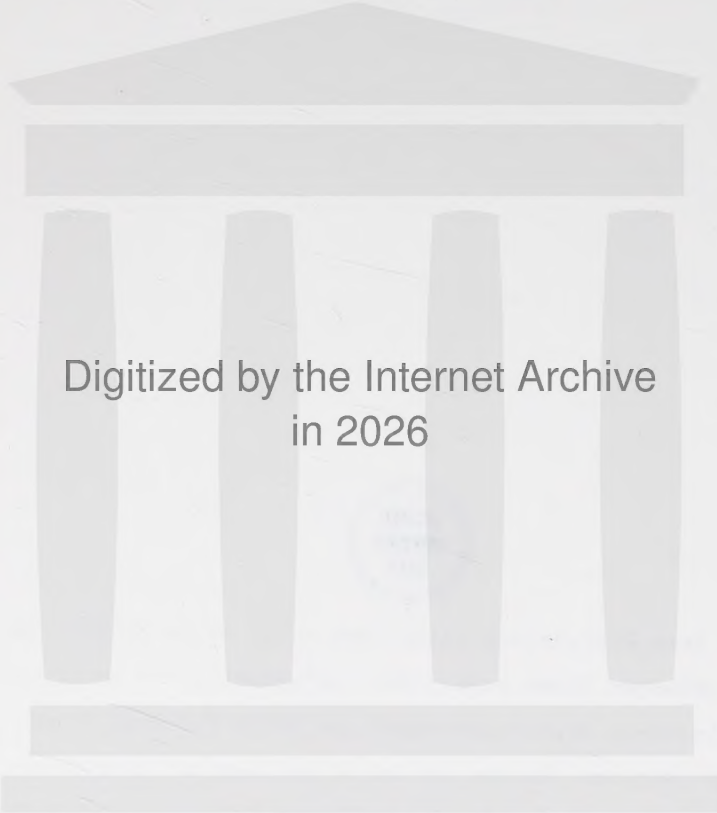
1. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Hartmann

2. Berichterstatter: Prof.Dr.H.G.Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 11.November 1977

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit vom Dezember 1973 bis August 1976 ausgeführt.

Herr Prof. Dr. H. G. Zachau hat durch seine Anteilnahme und Anregungen diese Arbeit sehr gefördert; dafür danke ich vielen. Herrn Dr. W. Wintermeyer und Herrn P. D. Dr. R. Thiede danke ich herzlich für die vielen Ratschläge und Diskussionen, die mir oft sehr geholfen haben. Meinen Kollegen hier danke ich für anregende Diskussionen und die Überlassung von Material.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Umsetzungen von tRNA ^{Phe} _{-YWye} mit Aminen	7
2.1. Untersuchung der Reaktionsfähigkeit von primären Aminen	9
2.2. Quantitative Nachweismethode für die Kondensation an der freien Ribose in tRNA ^{Phe} _{-YWye}	12
2.3. Untersuchung der Produkte der Umsetzung von tRNA ^{Phe} _{-YWye} mit Methylamin, Anilin und Aminopyren	16
2.4. Umsetzungen mit Aminopyren	17
2.5. Untersuchung der Stabilität von tRNA ^{Phe} _{Apn}	20
2.6. Chromatographie über BD-Cellulose	20
2.7. Präparation von tRNA ^{Phe} _{-YWye} ox	22
2.8. Umsetzungen mit tRNA ^{Phe} _{-YWye} ox	24
2.9. Untersuchung der Spezifität der Umsetzung verschiedener tRNAs mit Proflavin bei 50°C	26
2.10. Diskussion	26
3. Umsetzung von tRNA ^{Phe} _{-YWye} mit Hydrazinderivaten	28
3.1. Quantitative Analyse von hydrazinsubstituierter tRNA ^{Phe}	28
3.2. Umsetzungen mit Phenylhydrazin	31
3.3.1. Umsetzung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin	32
3.3.2. Umsetzung mit 9-Hydrazinoacridin	34
3.3.3. Umsetzungen mit 3-Hydrazinochinolin	36
3.3.4. Umsetzung von tRNA ^{Phe} _{-YWye} mit Dimethylhydrazin	38

3.3.5.	Weitere Umsetzungen unter Standardbedingungen	39
3.4.	Oligonukleotidanalysen der tRNA ^{Phe} -Derivate	40
4.	Untersuchung der Hydrazin-substituierten tRNA ^{Phe} -Derivate in biologischen Testsystemen	42
4.1.	Poly(U)-abhängige Bindung an Ribosomen aus Hefe	42
4.2.	Poly(U)-abhängige Bindung an Ribosomen aus E. coli	45
4.3.	Aminoacylierung der tRNA ^{Phe} -Derivate mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus E. coli	46
4.4.	Diskussion	48
5.	Beschreibung der Versuche	51
5.1.	Spaltung von tRNA ^{Phe} _{-YWye} mit Anilin	51
5.2.	Spaltung von tRNA ^{Phe} _{-YWye} mit Aminen	51
5.3.	Nachweis der Substitution der freien Ribose in tRNA ^{Phe} _{-YWye}	51
5.4.	Kondensation von tRNA ^{Phe} _{-YWye} mit Aminen	53
5.5.	Reduktion mit NaBH ₄	53
5.6.	Umwandlung der freien Ribose in tRNA ^{Phe} _{-YWye} in Erythrose	53
5.7.	Umsetzungen mit Hydrazinderivaten	54
5.8.	Aufarbeitung der tRNA nach der Umsetzung mit primären Aminen oder Hydrazinderivaten	54
5.9.	Spaltung mit T1-RNAase	54
5.10.	Chromatographie von T1-RNAase-Hydrolysaten	55

	Seite
5.11. Aminoacylierung von tRNA ^{Phe} und tRNA ^{Phe} -Derivaten mit Phenylalanyl- tRNA-Synthetase aus Hefe	55
5.12. Aminoacylierung mit Phenylalanyl- tRNA-Synthetase aus E. coli	56
5.13. Präparation von Ribosomen aus Hefe	56
5.14. Poly(U)-abhängige Bindung an Riboso- men aus Hefe	56
5.15. Präparation von Ribosomen aus E.coli	57
5.16. Poly(U)-abhängige Bindung an Riboso- men aus E. coli	57
5.17. Chromatographie über RPC-5-Säulen	58
5.18. Disk-Elektrophorese in Polyacryl- amid-Gelen	58
5.19. Radioaktivitätsmessungen	60
5.20. Apperative Hilfsmittel	60
5.21. Materialien	60
6. Zusammenfassung	63
7. Literaturverzeichnis	66
Verzeichnis der Abkürzungen	71

1. Einleitung und Problemstellung

Die tRNAs haben in der Biosynthese der Proteine eine zentrale Bedeutung (1). Obwohl die Tertiärstruktur einer tRNA inzwischen bekannt ist (2,3), ist der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion nicht in allen Einzelheiten verstanden.

Ein besonderes Kennzeichen der tRNAs ist das häufige Vorkommen modifizierter Nukleoside, die sich oft in analogen Positionen der tRNA-Moleküle befinden. Aus diesen Analogien kann man folgern, daß den modifizierten Nukleosiden eine wesentliche Bedeutung zukommen muß (4). Die Wirkung der seltenen Nukleoside ist in verschiedenen Bereichen vorstellbar:

1. Fertigstellung der tRNA-Vorläufer
2. Schutz der fertigen tRNA-Moleküle gegen unspezifischen Abbau
3. Ausbildung von Erkennungsmerkmalen für spezifisch abbauende Enzyme
4. Aufrechterhaltung der aktiven Konformation der tRNA
5. Biologische Wirkung nach dem Abbau der tRNA-Moleküle, z.B. als Nukleosid oder freie Base
6. Kombination der aufgeführten Möglichkeiten.

In keinem Fall konnte bisher eine eindeutige Beziehung des seltenen Nukleosids zur Funktion hergestellt werden. Die Tatsache, daß sich in vielen tRNAs neben dem 3'-Ende des Anticodons ein hochmodifiziertes Nukleosid befindet, läßt vermuten, daß der Base in dieser Position eine besondere Bedeutung für die Codon-

Anticodon-Wechselwirkung, z.B. die Aufrechterhaltung der aktiven Konformation der Anticodonschleife, zukommt. Das Auftreten bestimmter Adeninderivate, von N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl)-adenin neben dem Anticodon von E. coli tRNAs, deren zugehöriges Codon mit U beginnt, bzw. von N-(Purin-6-ylcarbamoyl)-threonin, wenn das Codon mit A beginnt (4), unterstützt die Annahme eines Zusammenhangs zwischen Stabilität des Codon-Anticodon-Komplexes und Anwesenheit eines modifizierten Nukleosids neben dem Anticodon.

Experimentell konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit oder Unversehrtheit dieser modifizierten Basen für gute Ribosomenbindung notwendig ist (5-10). Die Modifizierung von N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl)-adenin in tRNA^{Ser} beeinträchtigt die Bindung dieser tRNA an Ribosomen (5,10). Fehlt der Isopentenylrest vollständig, bindet die tRNA nicht mehr an Ribosomen (7). Auch für N-(Purin-6-ylcarbamoyl)-threonin aus E. coli tRNA konnte die Notwendigkeit der intakten Struktur dieser Base für die Bindung der tRNA an Ribosomen nachgewiesen werden (9).

In tRNA^{Phe} aus Eukaryonten findet sich neben dem 3'-Ende des Anticodons die hochmodifizierte Base Wye (vgl. Anmerkung im Abkürzungsverzeichnis) oder ein Derivat davon. Diese Base gewinnt zusätzliches Interesse durch den Befund, daß in tRNA^{Phe} aus Tumorzellen kein Wye vorkommt (11). In tRNA^{Phe} aus Hefe (Abb.1) befindet sich in 3'-Stellung neben dem Anticodon die hochmodifizierte Base YWye (Abb.2).

Spektroskopische Untersuchungen mittels Fluoreszenz (12,13) oder Kernresonanzmessungen der Methylprotonen (14) haben Hinweise auf eine besondere Funktion der Base YWye bei der Ausbildung der nativen Konformation der Anticodon-Schleife erbracht.

Die Base YWye hat eine hydrophobe Seitenkette. Chemische Veränderungen dieser Seitenkette beeinflussen die Aktivität der tRNA^{Phe} aus Hefe nicht (15). Bei tRNA^{Phe} aus Weizen bewirkte die Modifizierung der Seitenkette der Base Wybutoxin eine geringe Verminderung der Aktivität in der Polyphenylalanin-Synthese (16). Da man auch eine Wye-Base ohne Seitenkette gefunden hat (*Torulopsis utilis* (17)), kann man schließen, daß die Seitenkette, zumindest für die Proteinbiosynthese, keine essentielle Bedeutung hat.

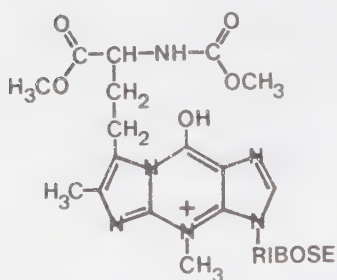


Abb.2 Seltenes Nukleosid
Wybutosin (yW)(18)

Eine besondere Eigenschaft des Nukleosids yW und seiner Derivate ist die leichte Abspaltbarkeit der Base YWye durch Hydrolyse (6). Während die so hergestellte $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{-YWye}}$

durch Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe immernoch gut

aminoacyliert wird, geht die Aktivität im heterologen Aminoacylierungstest mit Synthetase aus *E. coli* praktisch vollständig verloren (20). Auch die Aktivität im

Ribosomensystem aus Hefe oder E. coli ist stark vermindert oder völlig unterdrückt (6). Aus diesen Befunden folgt jedoch nicht eindeutig, daß die Base Ywe eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der nativen Konformation der tRNA^{Phe} hat, die nicht auch von einer unmodifizierten Base erfüllt werden könnte. Die vollständige Abspaltung einer Base ist möglicherweise immer eine so grobe Störung des Moleküls, daß Rückschlüsse auf eine besondere Funktion dieser Base nicht sicher erscheinen.

Durch Kondensation der freien Aldehydgruppe der tRNA^{Phe}_{-Ywe} mit den primären aromatischen Aminen Proflavin und Ethidium konnten tRNA-Derivate hergestellt werden, die gute bis mittlere Aktivität in den angeführten Testsystemen zeigten (21,22). Proflavin und Ethidium sind jedoch der Base Ywe ähnlich in ihrer Eigenschaft, mit benachbarten Basen der Nukleinsäure starke Wechselwirkungen der aromatischen π -Elektronensysteme einzugehen. Es blieb demnach offen, ob die Wiederherstellung der Aktivität auf derartige Wechselwirkungen zurückzuführen ist oder ob die Auffüllung der durch die Abspaltung von Ywe entstandenen Lücke allein schon ausreicht, um die Aktivität der tRNA^{Phe} zu erhalten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nun, durch Kondensation mit der Aldehydgruppe der tRNA^{Phe}_{-Ywe} verschiedene Substituenten in das tRNA-Molekül einzuführen und den Einfluß dieser Substitutionen auf die Aktivität der tRNA^{Phe} in den oben genannten Testsys-

temen zu untersuchen.

Über das Interesse an der Funktion der Base Ywe hinaus war die Ausarbeitung der Bedingungen, unter denen an der Aldehydgruppe der $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$ Kondensationen vorgenommen werden können, auch allgemein wichtig für die gezielte Herstellung von spezifisch substituierten tRNAs. So hat die Einführung von Affinitäts- oder Fluoreszenzmarkierungen in das tRNA-Molekül für Untersuchungen der Raumstruktur oder Wechselwirkungen der tRNA zunehmende Bedeutung gewonnen. Da bei Aminen mit Komplikationen wie Spaltung der $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$ durch Amin-katalysierte β -Eliminierung (23) oder geringer Stabilität der Kondensationsprodukte zu rechnen war, mußte zunächst geklärt werden, welche Strukturmerkmale primäre Amine zur präparativen Herstellung von Kondensationsprodukten der $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$ geeignet machen. Als weitere Möglichkeit bot sich die Kondensation der $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$ mit Hydrazin-Derivaten an, da diese nicht die tRNA-Spaltung durch β -Eliminierung bewirken (24) und stabilere Kondensationsprodukte liefern sollten.

2. Umsetzungen von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Aminen

Unter milden Bedingungen reagiert native tRNA nicht mit primären Aminen. Dagegen können Carbonylgruppen in tRNA, die durch Perjodatoxidation des 3'-terminalen Adenosins (25) oder durch Abspaltung von einzelnen Basen (6) zugänglich wurden, mit Aminen zur Kondensation gebracht werden (22, 26, 27). In beiden Fällen ist mit Weiterreaktion zu rechnen, die durch Eliminierung des zur Carbonylgruppe β -ständigen Phosphorsäureesters zur Abspaltung des 3'-terminalen Nukleosids (25) bzw. zur Kettenspaltung der tRNA (23) führt.

Bei $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ wird durch hydrolytische Abspaltung der hochmodifizierten Base YWye neben dem 3'-Ende des Anticodons eine Aldehydgruppe frei (6). Der Mechanismus der Reaktion von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Anilin wurde schon genau untersucht (23). In Abb. 3 sind die möglichen Reaktionen eines primärenamins mit der Ribose von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ schematisch dargestellt.

Im ersten Reaktionsschritt kondensiert ein Molekül Amin mit der Aldehydgruppe der tRNA. Unter säurekatalysierter Wasserabspaltung bildet sich das Kation einer Schiff'schen Base. Von dieser Reaktionsstufe aus sind drei Wege der Weiterreaktion möglich:

- A) Das Proton am C2 der Ribose ist aktiviert, sodaß ein zweites Molekül Amin dieses Proton abspalten und die Eliminierung des Phosphorsäureesters in 3'-Stellung der Ribose einleiten kann. Das dabei

gebildete Enol geht dann unter Tautomerisierung und Hydrolyse in den 2-Ketoaldehyd über, der das Endprodukt des Eliminierungsprozesses ist.

- B) Der Reaktionsablauf stoppt auf der Stufe der Schiff'schen Base, sodaß die Isolierung eines stabilen Kondensationsproduktes möglich ist.
- C) Das Kondensationsprodukt zerfällt wieder in seine Ausgangsverbindungen (Hydrolyse).

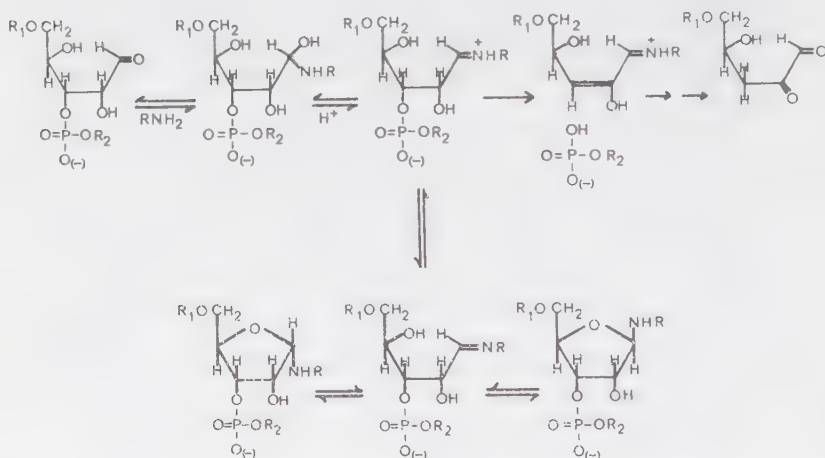


Abb.3 Schematische Darstellung der Reaktionsmöglichkeiten der freien Ribose in tRNA^{Phe}_{-YWye} mit primären Aminen

R₁ und R₂ deuten die Fortsetzung der RNA-Kette zum 5'- bzw. 3'-Ende an (verändert nach (23,28)).

Welche Eigenschaften des reagierenden Aminmoleküls die einzelnen Reaktionsabläufe bestimmen, war unbekannt. Nach den bisher vorliegenden Literaturdaten war anzunehmen, daß der pK-Wert des Amins Einfluß auf den Reaktionsablauf hat. Daneben scheint auch die Konzentration des Amins eine wesentliche Rolle zu spielen. So ist für Anilin beschrieben (29), daß unterhalb einer Minimalkonzentration, die jedoch um drei Größenordnungen über der tRNA-Konzentration liegt, keine Spaltung der tRNA in Halbmoleküle mehr stattfindet. Ob unter diesen Bedingungen schon Kondensation stattgefunden hatte, war nicht untersucht worden.

2.1. Untersuchung der Reaktionsfähigkeit von primären Aminen

Um bessere Auswahlkriterien für primäre Amine, die zum Kondensationsprodukt ohne Kettenspaltung führen, zu erhalten, erschien es notwendig, zunächst eine möglichst große Zahl von Aminen auf ihre Reaktionsfähigkeit mit $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ zu prüfen. Der Spaltung von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ durch Amine in Halbmoleküle muß die Kondensationsreaktion vorausgegangen sein (23). Das Auftreten von Halbmolekülen kann daher als Kriterium für die Reaktionsfähigkeit einer Aminoverbindung gelten. Das Nichtauftreten von Halbmolekülen in diesem Test bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß keine Kondensation stattgefunden hat. Die Ergebnisse dieser Testreihe sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab.1 Umsetzung von tRNA^{Phe}_{-Ywe} mit primären Aminen

Base	pK _a	pH der Umsetzung	Spaltung	pK _a -Lit.
Methylamin	10.6	3-10	-	29
Äthanolamin	9.5	10	(+)	29
Taurin	9.1	8.5	-	29
1,6-Diamino-hexan	11.8 10.8	10	(+)	29
ε-Aminocapron-säure	11.6	10,8.5	-	30
Spermin		4	-	
Spermidin		4	-	
Tetraäthylen-pentamin	9.92 9.08 7.87 4.25 2.65	4	+	30
Glycin	9.8	10	-	29
Lysin	10.5	8 6,4	+ -	29
Phenylalanin	9.2	10	-	29
β-Alanin	11	10	-	30
Anilin	4.6	5 8	+++ -	29
p-Aminophenol	10.3	7	+++	30
3-Aminopyren		4	+++	30
5-Aminouracil		5	-	
9-Aminoacridin		4,9	-	
Histamin	9.8	8.5	+	30
Tyramin	9.5	8.5	+	30
Tryptamin	10.2	8.5 4	+++ -	30

tRNA^{Phe}_{-Ywe} (20 μ M) wurde bei 37°C mit 0.2 M Amin zwei Stunden bei den angegebenen pH-Werten inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 20 μ l. Die Proben wurden direkt nach der Inkubation mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf Halbmoleküle untersucht (5.18).

- keine Halbmoleküle, (+) Halbmolekülanteil unter 10%,
+ Halbmolekülanteil 10 bis 30%, ++ Halbmolekülanteil 30 bis 60%, +++ Halbmolekülanteil über 60%

Um Aufschlüsse über das Mengenverhältnis Kondensationsprodukt-Spaltprodukte zu erhalten, mußte eine Methode entwickelt werden, die unabhängig von dem eingesetzten Amin ein Maß für die Kondensation an der Ribose in tRNA^{Phe}_{-YWye} geben kann. Mit dieser Methode (2.2.) wurden Anilin und Aminopyren genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in 2.3. wiedergegeben.

Die Amine, die in diesem Testsystem nicht zur Spaltung der tRNA in Halbmoleküle führen, lassen mit Ausnahme von Methylamin Schlüsse auf Eigenschaften zu, die die Reaktion mit der ribosidischen Carbonylgruppe der tRNA^{Phe}_{-YWye} verhindern oder zumindest stark beeinträchtigen. Eine negative Ladung in der Nähe der reaktiven primären Aminogruppe, wie z.B. eine Carboxylgruppe, inhibiert unter den untersuchten Bedingungen die Spaltung der tRNA in Halbmoleküle. Die beiden Polyamine Spermin und Spermidin stabilisieren die Struktur der tRNA. Es ist leicht vorstellbar, daß durch diese Rigidität des tRNA-Moleküls der Zugang zu der reaktionfähigen Carbonylgruppe versperrt ist. Eine Stütze dieser Vorstellung liefert der Befund, daß auch hohe Überschüsse dieser Polyamine nicht zu Spaltung führen (32).

Der Befund, daß Methylamin keine Spaltung der tRNA^{Phe}_{-YWye} in Halbmoleküle bewirken kann, war überraschend. Da an dieser Verbindung im Verlauf einer systematischen Untersuchung besonderes Interesse bestand, wurde die Kondensation ausführlich mit der in 2.2. beschriebenen Methode untersucht. Die Ergebnisse

sind in 2.3. wiedergegeben.

2.2. Quantitative Nachweismethode für die Kondensation an der freien Ribose in tRNA^{Phe}_{-YWye}

Der quantitative Nachweis der Kondensationsreaktion, unabhängig von dem eingesetzten Reagens, kann durch Einführung einer radioaktiven Markierung erfolgen. Dies wird möglich durch den Befund, daß die freie Ribose in tRNA^{Phe}_{-YWye} mit radioaktivem NaBH₄ zum Ribit reduziert werden kann. Dabei wird ein nicht austauschbares Tritiumatom kovalent an das C1 des Ribits gebunden. Durch Perjodatoxidation der tRNA nach modifizierten Bedingungen des Whitfeld-Abbaus (5.4.) kann das C1 des Ribits abgespalten werden. Damit wird das an das C1 gebundene Tritiumatom aus der tRNA entfernt (Abb.5). Das radioaktiv markierte sekundäre Amin, das durch Reduktion der Schiff'schen Base entsteht, wird von Perjodat nicht angegriffen. Die nach der Perjodatoxidation in der tRNA verbleibende Radioaktivität ist demnach ein Maß für die Ausbeute der Kondensationsreaktion. Zur Eichung wurde die maximal erreichbare spezifische Radioaktivität des Dodekanukleotid(-YWye) aus mit ³H-NaBH₄ reduzierter, jedoch nicht oxidierter tRNA^{Phe}_{-YWye} bestimmt. Dieser Wert entspricht der spezifischen Radioaktivität des vollständig mit Amin substituierten Dodekanukleotids nach der Perjodatoxidation. Als Kontrolle diente das Dodekanukleotid aus mit ³H-NaBH₄ reduzierter und anschließend oxidierter tRNA^{Phe}_{-YWye}.

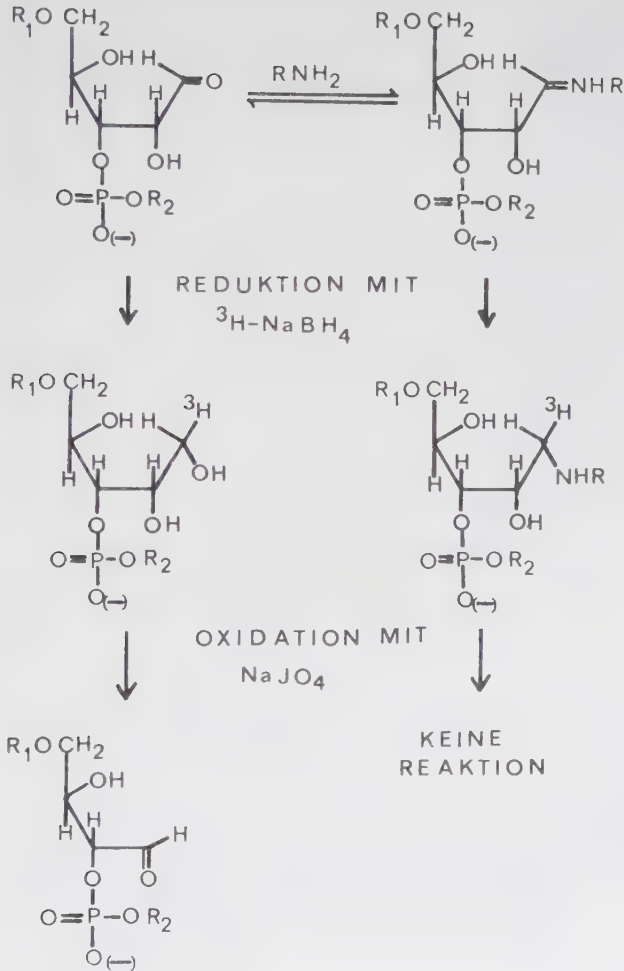


Abb.4 Schematische Darstellung der Methode zum quantitativen Nachweis der Kondensation der freien Ribose von tRNA^{Phe}-YWye mit primären Aminen.

R₁ und R₂ deuten die Fortsetzung der RNA-Kette zum 5'- bzw. 3'-Ende an.

Der Reaktionsablauf ist schematisch in Abb.4 dargestellt.

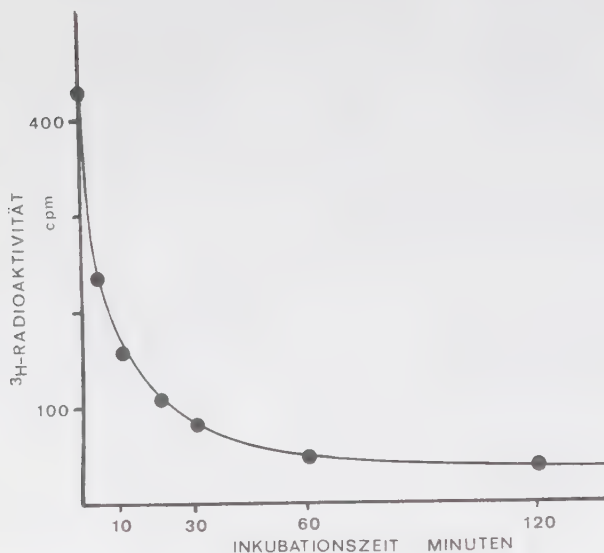


Abb.5 Perjodatoxidation des radioaktiven Ribits
in reduzierter tRNA^{Phe}_{-Wye}

Die Reaktionsmischung enthielt $32 \mu\text{M}$ tRNA^{Phe}_{-Wye} red, 10mM NaJO₄, 40mM Natriumacetat (pH 5.3) und 2mM MgCl₂. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe eines Glykol-Äthanol-Gemischs gestoppt. Die Weiterbehandlung erfolgte sinngemäß nach 5.3.

Neben der freien Ribose wird auch Dihydrouracil in tRNA^{Phe}_{-Wye} durch NaBH₄ reduziert (15). Diese Nebenreaktion ließ sich unter den hier verwendeten Reduktionsbedingungen (5.3.) zwar weitgehend zurückdrän-

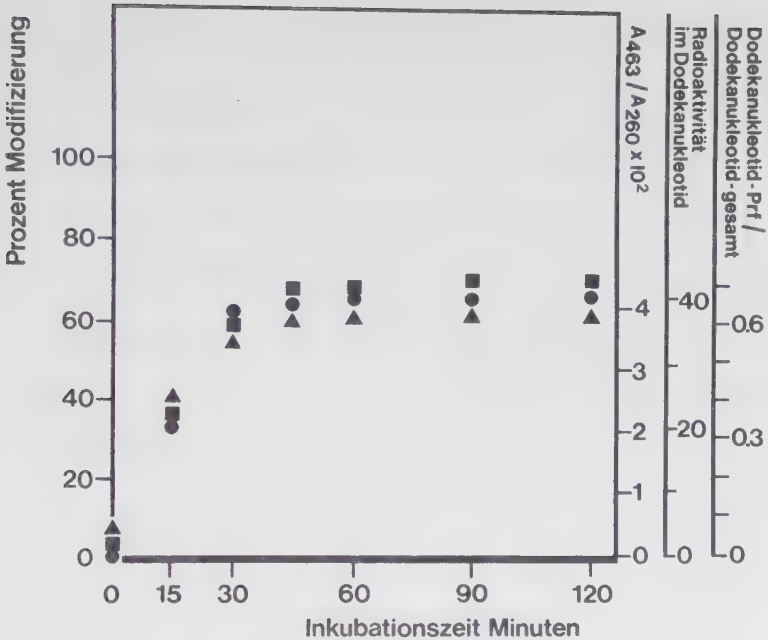


Abb.6 Quantitativer Nachweis der Kondensation von Prf mit $tRNA^{Phe}_{-YWye}$ nach drei verschiedenen Methoden

$tRNA^{Phe}_{-YWye}$ wurde mit einem 250-fachen Überschuß Prf in 0.1 M Natriumacetat (pH 4.3) bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und nach 5.8. aufgearbeitet. In diesen Proben wurden drei Parameter bestimmt:

- 1) Extinktion bei 260 nm und bei 463 nm
- 2) Radioaktivität im Dodekanukleotid nach 5.3.
- 3) Flächen der Dodekanukleotide (-YWye bzw. +Prf)

■ A_{463} / A_{260}

▲ Radioaktivität der Dodekanukleotide (-YWye und +Prf) in cpm pro cm^2 (5.3.)

● Dodekanukleotid (+Prf) pro Dodekanukleotid (-YWye)

gen, jedoch nicht vollständig unterdrücken. Der Tritiumeinbau in die freie Ribose bzw. Schiff'sche Base an der Position 37 wurde deshalb am Dodekanukleotid(-YWye) gemessen, das durch T1-RNAase-Spaltung aus $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ entsteht und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Damit wurde gleichzeitig das Problem der radioaktiven Verunreinigungen, die zu erheblichen Streuungen der Meßwerte führen können, umgangen.

Die Zuordnung der einem Tritiumatom entsprechenden Radioaktivität ist aufgrund der nur schwierig bestimmbaren spezifischen Radioaktivität des NaBH_4 nicht mit ausreichender Genauigkeit möglich. Die mit dieser Reduktionsanalyse erhaltenen Ergebnisse wurden mit zwei weiteren unabhängigen Meßwerten, Extinktion und Verhältnis der Menge der aus der Reaktionsmischung entstandenen Dodekanukleotide(-YWye bzw. +Prf), die sich wegen ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit getrennt bestimmen lassen, überprüft. Die für die Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Prf erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 6 graphisch dargestellt. Die Genauigkeit der Methode ist als besser als $\pm 5\%$ anzunehmen.

2.3. Untersuchung der Produkte der Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Methylamin, Anilin und Aminopyren

Für eine systematische Variation des Substituenten der Ribose in $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ stellen Methylamin, Anilin und Aminopyren wichtige Verbindungen dar. Deshalb

wurde untersucht, ob das in 2.1. beschriebene Ausbleiben der Spaltung der $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ durch Methylamin auf die Bildung einer stabilen Kondensationsverbindung zurückzuführen war. Für Anilin mußte geklärt werden, ob bei einem Aminüberschuß, der nur geringe Mengen Halbmoleküle liefert, Kondensationsprodukt nachweisbar ist. Bei Aminopyren sollte gezeigt werden, daß die Kondensationsreaktion mit $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ stattgefunden hatte. Es bestand hier die Möglichkeit, daß die nach der Inkubation der $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Aminopyren gefundene Fluoreszenz nur an Halbmoleküle gebunden war. Die in 2.2. beschriebene Analysenmethode war dazu geeignet, denn Halbmoleküle können bei der Spaltung mit T1-RNAase kein Dodekæ nukleotid(+Apn) liefern. Bei den verwendeten Reaktionsbedingungen (5.4.) konnte bei Methylamin und Anilin kein Kondensationsprodukt nachgewiesen werden. Für Aminopyren wurden nach einer Stunde Inkubation 15% Kondensationsprodukt gefunden. Der Anteil an Halbmolekülen betrug hier 60%.

2.4. Umsetzungen mit Aminopyren

Aminopyren ist ein ausgedehntes aromatisches Molekül und besitzt Fluoreszenzeigenschaften, die eine damit modifizierte tRNA zu Versuchen über Energietransfer, Fluoreszenzpolarisation und ähnlichem geeignet erscheinen lassen. Das Pyrensystem wurde schon früher als Pyrenbuttersäurehydrazid an das perjodat-oxidierte 3'-Ende von tRNA-Molekülen kovalent gebunden (36).

Die Umsetzung von tRNA^{Phe}_{-YWye} mit Aminopyren unter den in 5.4. beschriebenen Reaktionsbedingungen liefert etwa 15% tRNA^{Phe}_{ADH}. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde die Abhängigkeit der Ausbeute an Kondensationsprodukt von pH, Überschuß an Reagens und Temperatur untersucht (Abb. 7 und Abb. 9). Die Schwerlöslichkeit

von Apn in Wasser machte ausführliche Untersuchungen mit Lösungsmitteln notwendig. Aus der Reihe der untersuchten Lösungsmittel führte nur die Zugabe von HMPT zu homogenen Lösungen. Bei allen anderen untersuchten Lösungsmitteln führte die Zugabe der wässrigen tRNA-Lösung bzw. Pufferlösung zu klumpigem Ausfällen des Farbstoffs.

Abb. 8 zeigt die Ausbeuten an Kondensationsprodukt in Abhängigkeit von dem eingesetzten

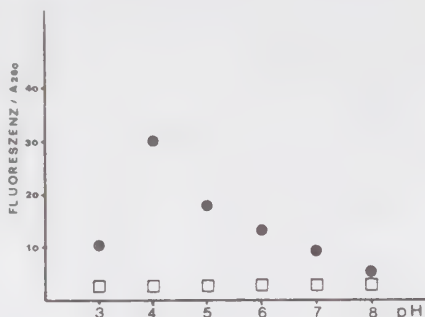


Abb. 7 Kondensation von tRNA^{Phe}_{-YWye} mit Apn in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umsetzung

Die Reaktionsmischung enthielt 16 μ M tRNA^{Phe}_{-YWye}, 1mM Apn, 0.1M Puffer und 20% Aceton. Als Puffer wurden verwendet: pH 3 Natriumcitrat, pH 4-6 Natriumacetat, pH 7 und 8 Tris-HCl. Die Reaktionsmischung wurde 60min bei 37°C inkubiert und nach 5.8. aufgearbeitet. Die Extinktion wurde bei 260nm, die Fluoreszenz bei 360nm Anregung und 435nm Emission gemessen.

● tRNA^{Phe}_{-YWye}, □ teilweise fraktionierte tRNA ohne tRNA^{Phe}

Überschuß. Ein über tausendfacher Apn-Überschuß liefert keine wesentliche Erhöhung der Ausbeute mehr, während gleichzeitig der Anteil an Halbmolekülen zunimmt. Die Verteilung der gemessenen Fluoreszenzintensität zwischen ganzer tRNA und Halbmolekülen

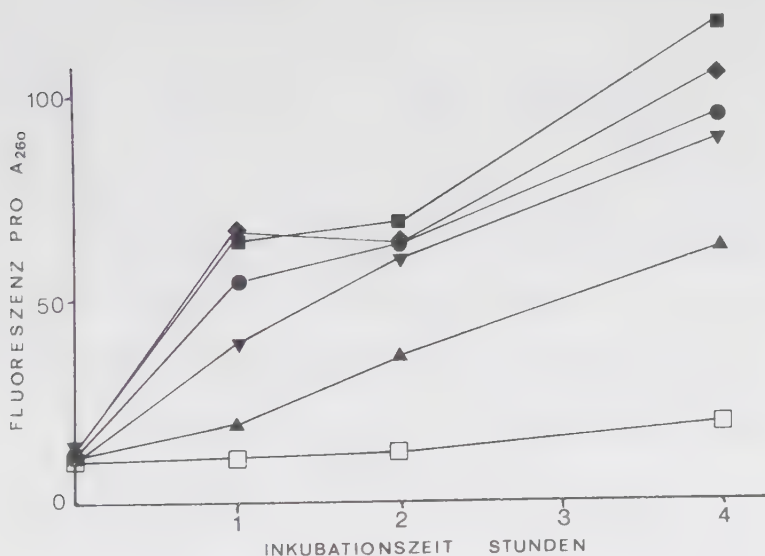


Abb.8 Inkubation von tRNA^{Phe}_{-YWye} mit verschiedenen Überschüssen Apn

tRNA^{Phe}_{-YWye} wurde mit den angegebenen Überschüssen Apn in HMPT in 0.1M Natriumacetat (pH 4) bei 27°C inkubiert. Der Anteil an Lösungsmittel betrug konstant 30%. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und nach 5.8. aufgearbeitet. Die Fluoreszenzintensität (360nm Anregung, 435nm Emission) wurde auf die A₂₆₀-Einheiten normiert. Als Kontrolle diente tRNA ohne tRNA^{Phe}. ▲ 250-facher Überschuss, ▼ 500-facher Überschuss, ◆ 1000-facher Überschuss, ■ 2000-facher Überschuss, ● 4000-facher Überschuss, □ Kontroll-tRNA

wurde nicht untersucht. Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50°C lieferte nur noch Halbmoleküle. Bei diesen Optimierungsversuchen zeigte sich klar, daß die Entstehung von Halbmolekülen bei dieser Reaktion nicht zu vermeiden ist. Um eine reine $\text{tRNA}_{\text{Apn}}^{\text{Phe}}$ zu erhalten, mußte die chromatographische Reinigung versucht werden.

2.5. Untersuchung der Stabilität von $\text{tRNA}_{\text{Apn}}^{\text{Phe}}$

Inkubiert man die nach 5.8. aufgearbeitete $\text{tRNA}_{\text{Apn}}^{\text{Phe}}$ bei pH 4, ist bereits nach 10 min die Fluoreszenz vollständig verschwunden (Abb.9). Auch bei neutralem pH verläuft die Hydrolyse des Farbstoffs von der tRNA so schnell, daß nach der für eine chromatographische Reinigung erforderlichen Zeit kein Farbstoff mehr an die tRNA gebunden ist (Abb.9).

In der Literatur ist die Stabilisierung von kovalent an $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ gebundenem Prf und Etd durch Reduktion mit NaBH_4 beschrieben (22). Reduziert man direkt nach der Inkubation mit Apn in der Inkubationsmischung mit NaBH_4 , findet keine Hydrolyse unter den beschriebenen Bedingungen (Abb.9) statt.

2.6. Chromatographie über BD-Cellulose

$\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ wurde wie in der Legende zu Abb.9 beschrieben mit Apn umgesetzt und reduziert. Die anschließende Chromatographie über eine BD-Cellulose-Säule (33) bewirkte keine Auftrennung in homogene Fraktionen. Die Untersuchung der Fraktionen mittels

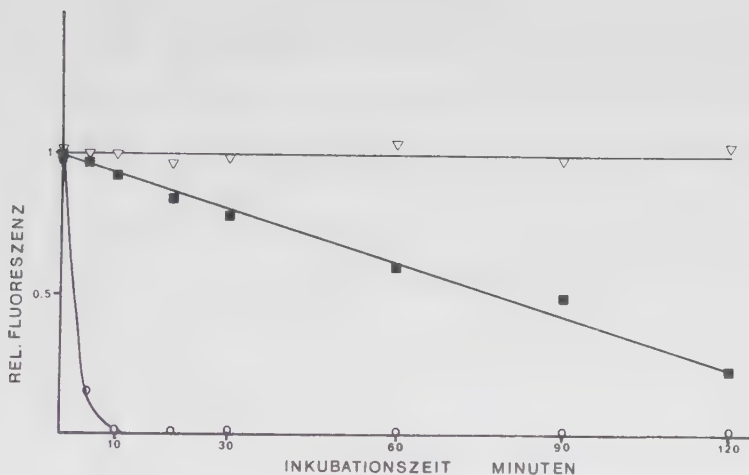


Abb. 9 Hydrolyse von kovalent an tRNA^{Phe}_{-tyr} gebundenem Apn in Abhängigkeit von pH und Inkubationsdauer

tRNA^{Phe}_{-tyr} wurde 2h bei 27°C mit einem 500-fachen Überschuß Apn in 0.1M Natriumacetat (pH 4) und 30% HMPT inkubiert und nach 5.8. aufgearbeitet. Die Lösung wurde in vier gleiche Volumina geteilt und folgender Behandlung unterworfen:

- 1) mit 0.2M Tris-HCl (pH 7.5) bei 37°C inkubiert ■
- 2) mit 0.2M Natriumacetat (pH 4) bei 37°C inkubiert ○
- 3) reduziert (5.5.) und wie 1) ▽
- 4) reduziert (5.5.) und wie 2) ▽

Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, nach 5.8. aufgearbeitet und Extinktion bei 260nm sowie Fluoreszenz bestimmt. Die gemessene Fluoreszenzintensität pro A₂₆₀-Einheit wurde auf 1 normiert gegen die Hydrolysedauer aufgetragen. Die Anfangsfluoreszenz entspricht einer Modifizierung der tRNA von etwa 30%.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte, daß die Halbmoleküle nicht abgetrennt worden waren und daß im Bereich der nicht in Halbmoleküle gespaltenen tRNA verschiedene Banden auftraten. Untersuchungen mit verschiedenen Reduktions- und Fällungsbedingungen nach der Umsetzung mit primären aromatischen Aminen lieferten Hinweise darauf, daß diese Heterogenität der tRNA bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Folge der Reduktion mit NaBH_4 in Anwesenheit primärer aromatischer Amine anzusehen ist. Sind die Kondensationsprodukte stabil genug, um die Standardaufarbeitung (5.8.) ohne Hydrolyse zu überstehen, bleibt die tRNA bei der Reduktion homogen. Dies erklärt, daß dieser Effekt bisher nicht bemerkt worden war.

Abschätzungen der auf diesem oben beschriebenen Wege erhältlichen Ausbeute an $\text{tRNA}_{\text{Apn}}^{\text{Phe}}$ ergaben Werte von wenigen Prozenten. Von weiteren Versuchen mit Apn wurde deshalb abgesehen.

2.7. Präparation von $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi

Die Eliminierung von Phosphatgruppen in 2-Stellung aus Ribosephosphat wird nicht von Aminen katalysiert (24). Eine $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$, in der das C1 der freien Ribose abgespalten ist, sollte deshalb von Aminen nicht mehr in Halbmoleküle spaltbar sein und somit ein geeignetes Substrat zur Umsetzung mit primären Aminen auch unter Spaltungsbedingungen darstellen.

Die Präparation ist in 5.6. beschrieben. Zum Beweis, daß in der so präparierten $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi statt

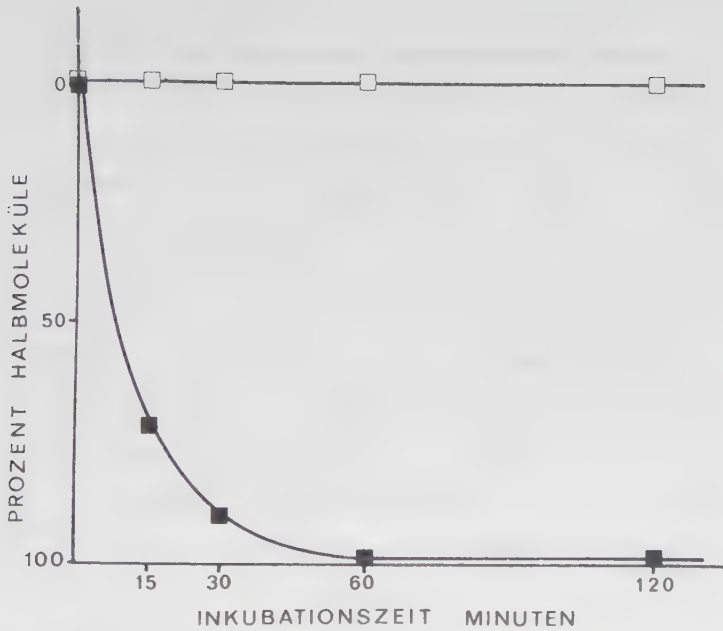


Abb.10 Umsetzung von tRNA^{Phe}_{-Y^Wye} und tRNA^{Phe}_{-Y^Wye}^{oxi} mit Phenylhydrazin

tRNA^{Phe}_{-Y^Wye} bzw. tRNA^{Phe}_{-Y^Wye}^{oxi} wurden mit einem 500-fachen Überschuß Phenylhydrazin in 0.1 M Natriumacetat (pH 5.5) umgesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und direkt der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen (5.18.).

□ tRNA^{Phe}_{-Y^Wye}

■ tRNA^{Phe}_{-Y^Wye}^{oxi}

der Ribose eine Erythrose vorliegt, wurde sie mit Anilin und Phenylhydrazin umgesetzt. Nach (24) sollte Phenylhydrazin Phosphatgruppen selektiv aus 2-Stellung, nicht aber aus 3-Stellung von Ribosephosphat abspalten, d.h. $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi sollte im Gegensatz zu $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ von Phenylhydrazin in Halbmoleküle gespalten werden. Die Umsetzung ist in Abb. 10 graphisch dargestellt. Die quantitative Spaltung der $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi durch Phenylhydrazin in Halbmoleküle zeigt, daß in dieser tRNA statt der Ribose an Position 37 eine Erythrose vorliegt. Im Einklang damit war der Befund, daß Anilin $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi nicht in Halbmoleküle spaltet.

2.8. Umsetzungen mit $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi

Mit der Präparation von $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi war im Prinzip das Substrat für Amineinbau ohne die Probleme der Spaltung in Halbmoleküle vorhanden. Wegen der leichten qualitativen und quantitativen Bestimmung der Kondensationsreaktion wurden die ersten Umsetzungen mit Prf unter den von $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ bekannten Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden nur mäßige Ausbeuten an Kondensationsprodukt erreicht (Abb. 11). Erhöhung der Aminkonzentration führte nicht zu besseren Ausbeuten. Umsetzung bei 50°C (Abb. 11) lieferte zwar höheren Farbstoffeinbau, führte jedoch zu Zweifeln an der Spezifität der Reaktion (vgl. 2.9.).

Der Befund, daß $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi selbst mit dem in $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ problemlos einbauenden Prf nur schlechte

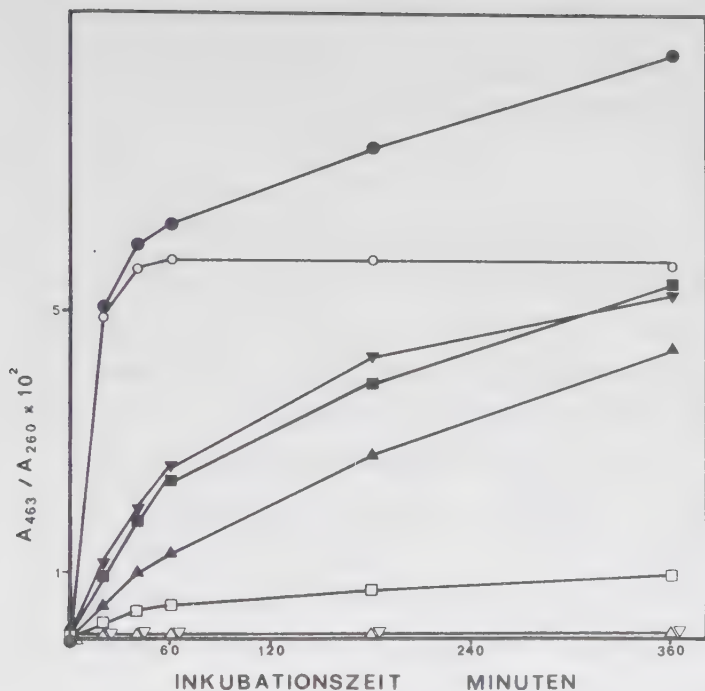


Abb. 11 Umsetzung verschiedener tRNAs mit Prf bei 37°C und bei 50°C

Aus der Reaktionsmischung, die 80 μ M tRNA, 40mM Prf und 50mM Natriumacetat (pH 4.3) enthielt, wurden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und nach 5.8. aufgearbeitet. Inkubationstemperatur war 37°C (offene Symbole) oder 50°C (ausgefüllte Symbole).

△ ▲ tRNA^{Phe}

○ ● tRNA^{Phe}_{-ywe}

▽ ▼ tRNA^{Ser}

□ ■ tRNA^{Phe}_{-ywe} oxi

Ausbeuten liefert, führte zu dem Schluß, daß $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi für die Kondensationsreaktion mit Aminen kein geeignetes Substrat darstellt, selbst wenn man berücksichtigt, daß man beliebig hohe Überschüsse einsetzen könnte.

2.9. Untersuchung der Spezifität der Umsetzung verschiedener tRNAs mit Proflavin bei 50°C

Bei 37°C reagiert Prf nur mit den freien Aldehydgruppen von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi, nicht aber mit tRNA^{Phe} und tRNA^{Ser} . Nach 6h Inkubationsdauer bei 50°C ist an alle vier tRNAs deutlich mehr Farbstoff gebunden als nach der Inkubation bei 37°C (Abb. 11). Offenbar reagiert Prf bei 50°C auch mit anderen Gruppen des tRNA-Moleküls. Bei der Kondensation der $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit primären Aminen können demnach keine Temperaturen über 37°C angewendet werden.

2.10. Diskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Kondensation von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit primären Aminen lassen einige Schlüsse für die Reaktion primärer Amine mit der freien Ribose der $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ zu. Der für Anilin gezeigte Reaktionsablauf (23) gilt im Prinzip für alle primären Amine. Spezielle Eigenschaften einzelner Moleküle können dazu führen, daß die reguläre Reaktion nicht vollständig abläuft (vgl. die in 2. unter B und C aufgeführten Möglichkeiten). Die Kondensationsfähigkeit einer primären Aminogruppe wird

durch benachbarte negative Ladungen, z.B. Carbonsäure- und Sulfonsäurereste, wesentlich beeinträchtigt oder vollständig unterdrückt.

Wie am Beispiel von Prf und Etd gezeigt (22), können andere Eigenschaften von amingruppentragenden Molekülen dazu führen, daß stabile Kondensationsprodukte entstehen und der normale Reaktionsablauf abgebrochen wird. Dies ist bei den ausgedehnten heteroaromatischen Molekülen der Fall, die sich dadurch auszeichnen, daß sie mit den benachbarten Adeninringen starke Wechselwirkungen eingehen. Zusätzlich müssen jedoch sterische Voraussetzungen erfüllt sein, wie die Befunde nahelegen, daß Prf mit $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ sehr gut, mit $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ oxi aber nur mäßig reagiert. Die Voraussetzungen zur Reaktion sind offenbar durch die Abspaltung des C1 der Ribose stark beeinträchtigt. Diese Vorstellung wird durch die Tatsache gestützt, daß 9-Aminoacridin nicht mit $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ reagiert, 9-Hydrazinoacridin mit der um ein Atom verlängerten reaktiven Gruppe jedoch sehr gut (vgl. 3.3.1.).

Allgemein zeigte sich, daß die beschriebenen Komplikationen Aminoverbindungen, mit den oben angeführten Ausnahmen, als nicht geeignet erweisen, eine systematische Variation der Substitution der Base YWye in $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ durchzuführen. Es war infolgedessen notwendig, andere carbonylaktive Verbindungen auf ihre Eignung zur Kondensation mit der freien Ribose in $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ zu untersuchen.

3. Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{-Ywye}}^{\text{Phe}}$ mit Hydrazinderivaten

Umsetzungen von Hydrazinderivaten mit der freien Ribose in $\text{tRNA}_{\text{-Ywye}}^{\text{Phe}}$ sind in der Literatur beschrieben, wobei genaue Angaben über die Ausbeute fehlen (34,35). Übereinstimmend mit Kochetkov et.al. (24), die jedoch nur die Abspaltung von Phosphatresten aus Ribosephosphat untersuchten, war in 2.7. für $\text{tRNA}_{\text{-Ywye}}^{\text{Phe}}$ gezeigt worden, daß Phenylhydrazin nicht in Halbmoleküle spaltet (Abb.10). Hydrazinderivate sollten sich demnach besser als Amine zur Kondensation mit der freien Aldehydgruppe von $\text{tRNA}_{\text{-Ywye}}^{\text{Phe}}$ eignen.

3.1. Quantitative Analyse von hydrazinsubstituierter tRNA^{Phe}

Voraussetzung für die Verwendung von Hydrazinderivaten war, daß die für Amine entwickelte Methode zur quantitativen Analyse der Kondensation (2.2.) auch auf Hydrazinderivate anwendbar war. Wendet man die Methode auf hydrazinsubstituierte tRNA^{Phe} an, findet man nach der Perjodatoxidation keine Radioaktivität in der tRNA. Offenbar werden Hydrazone unter diesen Bedingungen von NaBH_4 nicht reduziert (37). Bei der Analyse von hydrazinsubstituierter tRNA^{Phe} muß infolgedessen der Oxidationsschritt unterbleiben. Der Fortgang der Kondensationsreaktion kann direkt an der Abnahme der Menge reduzierbarer $\text{tRNA}_{\text{-Ywye}}^{\text{Phe}}$ verfolgt werden. Die mit dieser Methode erhaltenen Werte für die Kondensation von Hac mit

$tRNA_{-YWye}^{Phe}$ stimmten mit den Werten aus der Extinktionsmessung überein (Abb.13). Der Kontrollwert für die vollständige Substitution, d.h. minimale Radioaktivität im Dodekanukleotid, wurde mit dem Dodekanukleotid aus $tRNA_{-YWye}^{Phe}$ bestimmt, die vor der Reduktion mit

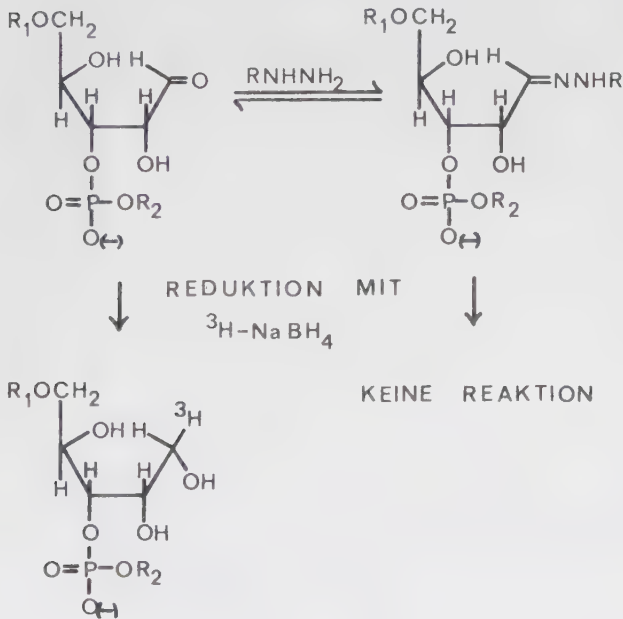


Abb.12 Schematische Darstellung der Methode zum quantitativen Nachweis der Kondensation der freien Ribose von $tRNA_{-YWye}^{Phe}$ mit Hydrazinderivaten

R₁ und R₂ deuten die Fortsetzung der RNA-Kette zum 5'- bzw. 3'-Ende an.

^3H - NaBH_4 mit nicht radioaktivem NaBH_4 behandelt worden war. Mit ^3H - NaBH_4 reduzierte $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ diente zur Eichung (vgl. 2.2.). Eine schematische Darstellung des Prinzips der Methode gibt Abb. 12.

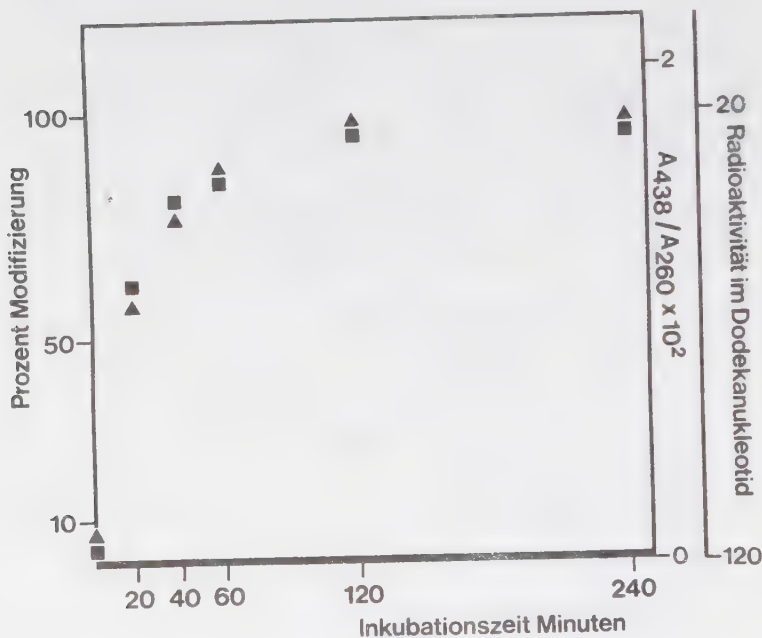


Abb. 13 Bestimmung der Kondensation von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Hac mit zwei verschiedenen Methoden

$\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ wurde mit einem 90-fachen Überschuß Hac in 0.1M Natriumacetat (pH 4) und 30% HMPT bei 27°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und nach 5.8. aufgearbeitet. In diesen Proben wurden 1. die Extinktionen bei 260nm und bei 438nm und 2. die Radioaktivität im Dodekanukleotid nach 5.3. bestimmt.

■ A_{438}/A_{260} , ▲ Radioaktivität im Dodekanukleotid (cpm/cm²)

3.2. Umsetzungen mit Phenylhydrazin

Die Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$ mit Phenylhydrazin führte zu einem raschen Verlust der Akzeptoraktivität (Abb.14). Die verschieden lang umgesetzten tRNA-Proben wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5.18) untersucht und zeigten keine Spaltung

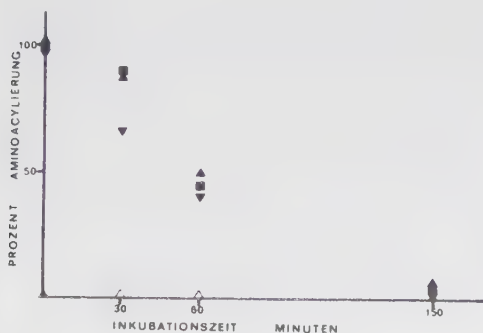


Abb.14 Akzeptoraktivität von $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$ in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Phenylhydrazin bei pH 4, pH 5 und pH 6

Die Reaktionsmischung enthielt $36 \mu\text{M}$ $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$, 10mM Phenylhydrazin und 80mM Natriumacetat (pH 4, pH 5 bzw. pH 6). Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, nach 5.8. aufgearbeitet und die Aminoacylierbarkeit mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe bzw. aus *E. coli* untersucht (5.11. und 5.12.). In beiden Versuchsanordnungen wurden die rohen Enzymfraktionen eingesetzt.

Homologe Aminoacylierbarkeit nach Inkubation bei pH 4 (■), pH 5 (▼) bzw. pH 6 (▲). Heterologe Aminoacylierbarkeit nach Inkubation bei pH 4, pH 5 und pH 6 (Δ).

in definierte Bruchstücke. Die Reaktion mit Phenylhydrazin ist in dem untersuchten Bereich pH-unabhängig und führt offenbar nach längerer Inkubation zu unspezifischen Substitutionsreaktionen mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{-\text{YWye}}$. Für die Wiederherstellung der heterologen Akzeptoraktivität wurden keinerlei Anzeichen gefunden.

Um trotzdem zu versuchen, eine reine substituierte tRNA^{Phe} zu erhalten, wurde nur kurze Zeit bei niedriger Temperatur inkubiert, um so die Aldehydgruppe bevorzugt zur Reaktion zu bringen. Bei der anschließenden Chromatographie über RPC-5 (5.9.) wurde ein sehr heterogenes Elutionsprofil gefunden. Es ist mit den untersuchten Reaktionsbedingungen nicht möglich, eine reine, nur an Position 37 mit Phenylhydrazin substituierte tRNA^{Phe} zu isolieren.

3.3.1. Umsetzung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Der zeitliche Verlauf der Einbaureaktion ist in Abb. 15A dargestellt. Unter diesen Bedingungen wird etwa die Hälfte der eingesetzten $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{-\text{YWye}}$ substituiert, während mit tRNA^{Phe} keine Reaktion stattfindet. Dnph ist in verdünnten Lösungsmitteln nur schlecht löslich. HMPT zeigte bei Versuchen zur Löslichkeit von Dnph und Hac (s.u.) in 50%-igen Lösungsmitteln die besten Lösungseigenschaften.

Die chromatographische Reinigung ist in Abb. 16 dargestellt. Der molare Extinktionskoeffizient wurde aus der reinen $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Dnph}}$ zu $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 360nm bestimmt.

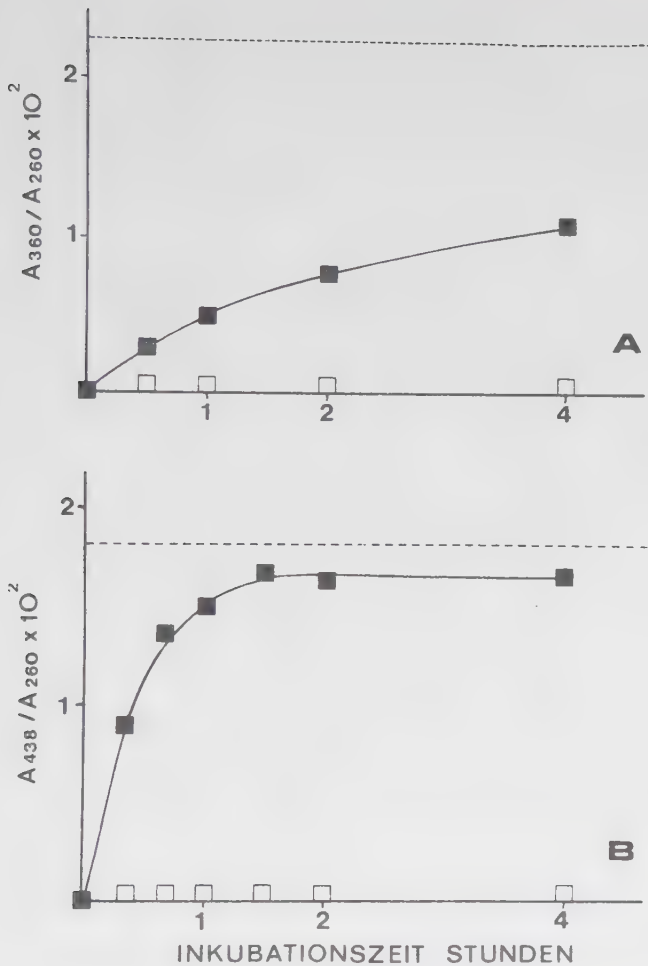


Abb.15 Kinetik des Einbaus von Dnph (A) und Hac (B) in $tRNA_{-YWye}^{Phe}$

Die Reaktionsbedingungen sind in 5.7. beschrieben. Zu den angegebenen Zeiten wurden aus der Reaktionsmischung Proben entnommen und nach 5.8. aufgearbeitet. Die gestrichelte Linie bezeichnet vollständige Substitution.

■ $tRNA_{-YWye}^{Phe}$

□ $tRNA^{Phe}$

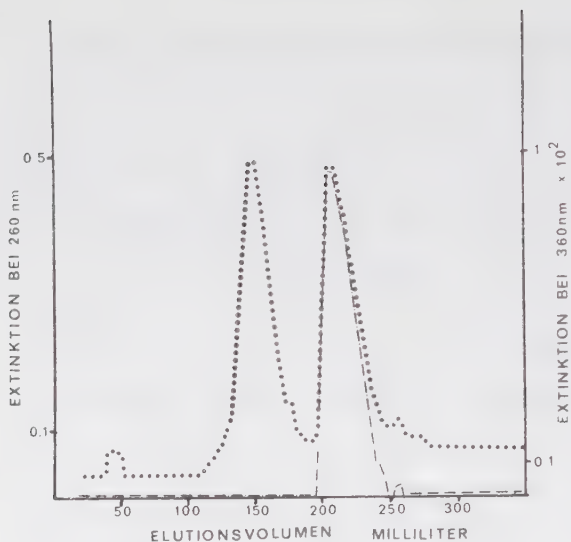


Abb.16 Säulenchromatographie von $tRNA_{DnpH}^{Phe}$

100 A_{260} -Einheiten $tRNA_{YWye}^{Phe}$ wurden nach 5.7. mit DnpH umgesetzt und nach 5.8. aufgearbeitet. Das Gemisch wurde an einer RPC-5-Säule (0.3 x 50cm) chromatographiert mit einem Gradienten von je 200ml 0.35 und 0.70M NaCl in 10mM Tris-HCl (pH 7.5) und 10mM $MgCl_2$.

.... Extinktion bei 260nm, —. Extinktion bei 360nm

3.3.2. Umsetzung mit 9-Hydrazinoacridin

Der zeitliche Verlauf der Einbaureaktion ist in Abb.15B graphisch wiedergegeben, die Isolierung über RPC-5 in Abb.17. Die Ausbeute errechnet sich mit dem Extinktionskoeffizienten des freien Farbstoffs ($9.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 435nm (31)) zu über 100%. Die Chromatographie zeigt jedoch, daß die Umsetzung

nicht quantitativ verlaufen ist (Abb.17).

Zur Bestimmung der Menge kovalent gebundenen Farbstoffs wurde aus der reinen $\text{tRNA}_{\text{Hac}}^{\text{Phe}}$ folgendes Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 438nm ermittelt:

$$\text{tRNA}_{\text{Hac}}^{\text{Phe}} : \text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}} = A_{438} : A_{260} = 1.82 \times 10^{-2}$$

Hac hat eine starke Absorption bei 260nm, daher müssen die bei 260nm gemessenen Extinktionswerte um die Farbstoffextinktion bei dieser Wellenlänge

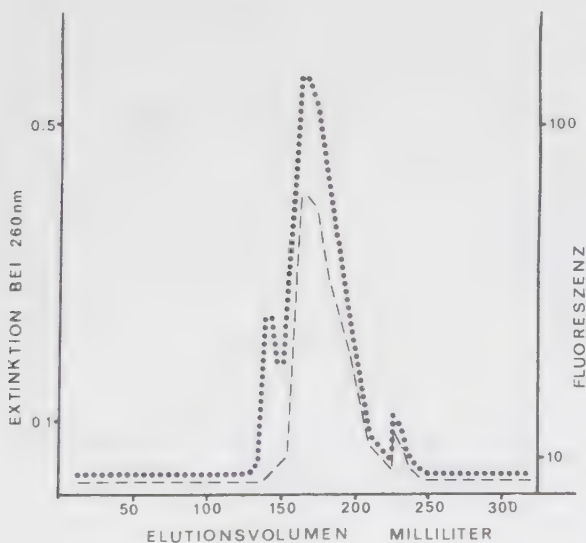


Abb.17 Säulenchromatographie von $\text{tRNA}_{\text{Hac}}^{\text{Phe}}$

50 A_{260} -Einheiten $\text{tRNA}_{-\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ wurden nach 5.7. mit Hac umgesetzt und nach 5.8. aufgearbeitet. Die Chromatographie wurde wie in Legende zu Abb.16 beschrieben, durchgeführt.

.... Extinktion bei 260nm, .-. Fluoreszenz (435nm Anregung, 470nm Emission)

($4.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (38)) korrigiert werden. Aus diesen Angaben errechnet sich für $\text{tRNA}_{\text{Hac}}^{\text{Phe}}$ ein molarer Extinktionskoeffizient von $1.14 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 438nm.

Aus der graphischen Darstellung der Einbaukurven von Dnph und Hac kann direkt das Verhältnis der Einbaugeschwindigkeiten abgelesen werden. Es ist ganz deutlich, daß die Geschwindigkeit der Einbaureaktion nicht nur vom Überschuß an Reagens abhängt. Offensichtlich bestimmen zusätzlich sterische Faktoren, die durch die tRNA bedingt sind, in erheblichem Umfang die Reaktionsgeschwindigkeit. Von Acridinderivaten ist bekannt, daß sie sich gut zwischen die Basen von Nukleinsäuren zu schieben vermögen (intercalieren). Es ist gut vorstellbar, daß eine Verbindung mit derartigen Eigenschaften leichter mit der Aldehydgruppe der $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$ zur Reaktion kommt als Dnph. Gestützt wird diese Vorstellung auch durch den Befund, daß die Ausbeute an Kondensationsprodukt bei Dnph mehr vom eingesetzten Überschuß abhängt als bei Hac. So führt die Steigerung des Überschusses von 500- auf 1000-fach bei Dnph zu einer 2.5-fach höheren Ausbeute, während sich bei Hac nichts an der Ausbeute ändert.

3.3.3. Umsetzungen mit 3-Hydrazinochinolin

Der zeitliche Verlauf der Einbaureaktion ist in Abb. 18 wiedergegeben, die chromatographische Reinigung in Abb. 19. Der molare Extinktionskoeffizient

wurde aus der reinen $\text{tRNA}_{\text{Hqn}}^{\text{Phe}}$ zu $2.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 325nm bestimmt.

Die hohe Einbaugeschwindigkeit im wässrigen System, die mit den in der Literatur für Prf und Etd (22) beschriebenen Werten vergleichbar ist, läßt den Schluß zu, daß im Prinzip Wasser das optimale Umsetzungsmedium darstellt. Von den untersuchten Lösungsmitteln hat offenbar HMPT diejenigen Eigenschaften, die die Reaktion am wenigsten negativ beeinflussen.

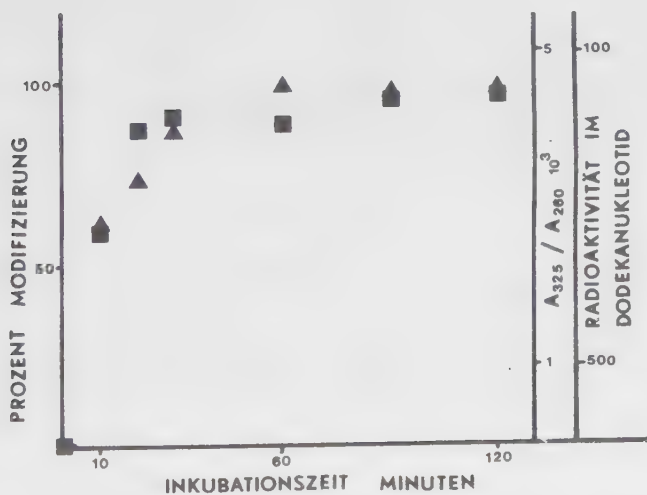


Abb.18 Kinetik der Reaktion von $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$ mit Hqn

Aus der Reaktionsmischung ($30 \mu\text{M}$ $\text{tRNA}_{\text{-Ywe}}^{\text{Phe}}$, 5.25 ml: Hqn, 62mM Natriumacetat (pH 4), 27°C Inkubationstemperatur) wurden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und nach 5.8. aufgearbeitet. In den Proben wurde 1. die Extinktion bei 260 und 325nm und 2. nach 5.3. die Kondensation bestimmt.

■ A_{325}/A_{260} , ▲ Radioaktivität im Dodekanukleotid (cpm/cm²)

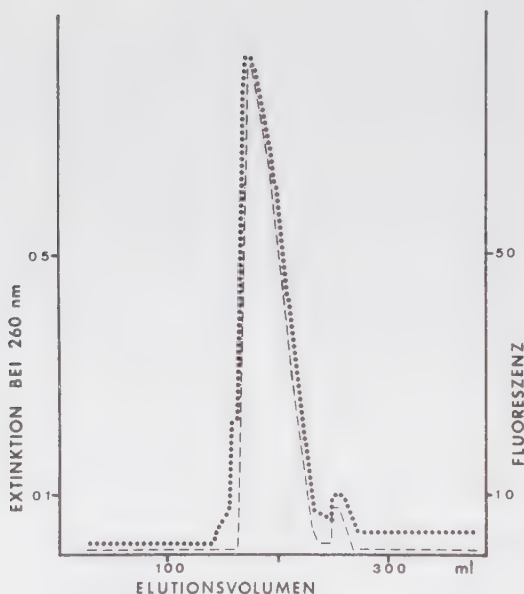


Abb.19 Säulenchromatographie von $\text{tRNA}_{\text{Hqn}}^{\text{Phe}}$

43 A_{260} -Einheiten $\text{tRNA}_{\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ wurden mit einem 175-fachen Überschuß Hqn in 62 mM Natriumacetat (pH 4) 45 min bei 27°C umgesetzt, nach 5.8. aufgearbeitet und wie in Legende zu Abb.16 beschrieben chromatographiert.

.... Extinktion bei 260 nm

..... Fluoreszenz (367 nm Anregung, 418 nm Emission)

3.3.4. Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Dimethylhydrazin

Die Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Dmh führte unter Standardbedingungen (5.7.) zu vollständiger Substitution, die nach 5.3. bestimmt wurde. Die chromatographische Reinigung ist in Abb.20 wiedergegeben.

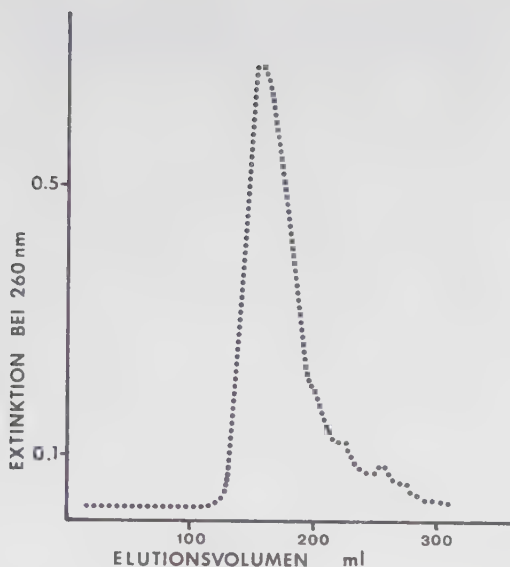


Abb.20 Säulenchromatographie von $\text{tRNA}_{\text{Dmh}}^{\text{Phe}}$

50 A_{260} -Einheiten $\text{tRNA}_{\text{Ywe}}^{\text{Phe}}$ wurden mit einem 2000-fachen Überschuß Dmh in 62mM Natriumacetat (pH 4) und 50% HMPT 5h bei 27°C inkubiert und nach 5.8. aufgearbeitet. Die Chromatographie wurde wie in Legende zu Abb.16 beschrieben durchgeführt.

3.3.5. Weitere Umsetzungen unter Standardbedingungen

Die aufgeführten Verbindungen lieferten unter Standardbedingungen (5.7.) die in Tab.2 wiedergegebenen Ausbeuten an substituierter tRNA^{Phe} , die nach 5.3. bestimmt wurden.

Tab.2 Ausbeuten der Umsetzung von tRNA^{Phe}_{-YWye} mit Hydrazinderivaten unter Standardbedingungen

	% Substitution
tRNA ^{Phe} _{Dmh}	100
tRNA ^{Phe} _{Agd}	100
tRNA ^{Phe} _{Tsc}	100
tRNA ^{Phe} _{Ptsc}	80
tRNA ^{Phe} _{Inh}	40

3.4. Oligonukleotidanalysen der tRNA^{Phe}-Derivate

Bei der Chromatographie eines T1-RNAase-Hydrolysets von tRNA^{Phe}_{Dnph} wurde nur im Dodekanukleotid Absorption bei 360nm beobachtet (Abb.21). Damit ist bewiesen, daß nur die freie Aldehydgruppe der tRNA^{Phe}_{-YWye} mit Dnph reagiert hat. Der Anteil von etwa 45% markiertem Dodekanukleotid stimmt mit dem aus dem A₃₆₀/A₂₆₀-Verhältnis bestimmten Gehalt von 0.45 Mol Dnph pro Mol tRNA des zur Analyse verwendeten Reaktionsgemischs überein. tRNA^{Phe}_{Hac} lieferte ein analoges Elutionsprofil, bei dem ebenfalls nur im Dodekanukleotid Fluoreszenz gefunden wurde. Durch diese beiden Analysen ist die Spezifität der Hydrazinsubstitution gezeigt.

Die anderen Hydrazin-substituierten tRNA^{Phe}-Derivate ließen sich nicht analog analysieren. Es erscheint jedoch gerechtfertigt, aufgrund der durchgeführten Analysen anzunehmen, daß auch mit den anderen Hydrazin-Derivaten neben der Kondensation mit der freien Ribose der tRNA^{Phe}_{-YWye} keine unspezifischen Reaktionen in

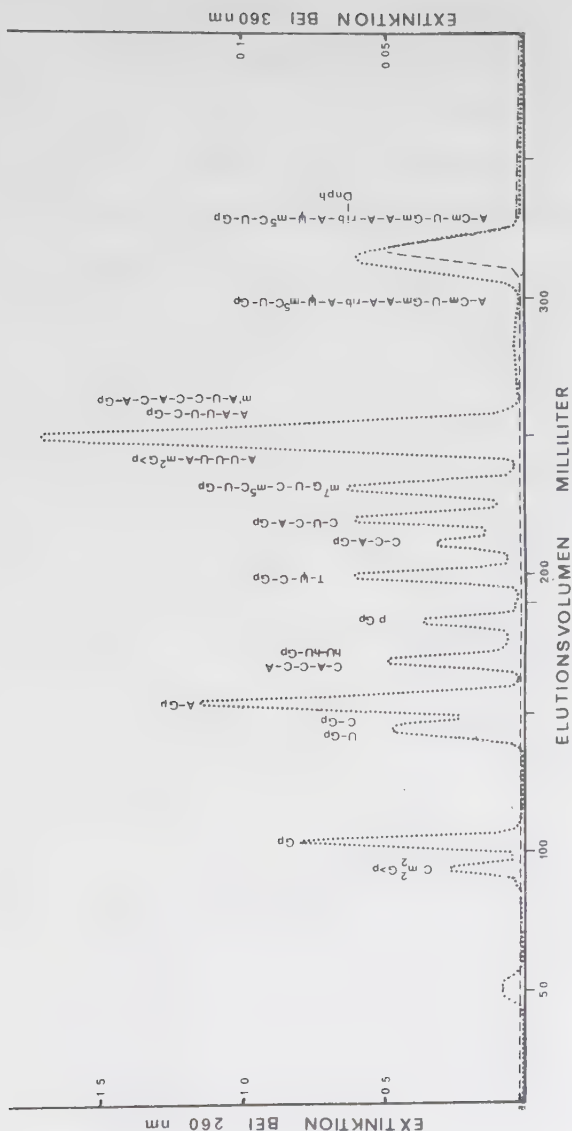


Abb. 21 Chromatographie eines T1-RNAase-Hydrolysats der tRNA^{Phe}_{DnpH} wurden mit 500 Einheiten T1-RNAase vollständig gespalten (5.10) und an DEAE-Cellulose chromatographiert (5.11).
 Extinktion bei 260nm, --- Extinktion bei 360nm

nennenswertem Ausmaß stattgefunden haben. Die gute Akzeptoraktivität der tRNA^{Phe}-Hydrazin-Derivate unterstützt diese Annahme.

4. Untersuchung der Hydrazin-substituierten tRNA^{Phe}-Derivate in biologischen Testsystemen

Die Aktivität der tRNA^{Phe}-Hydrazin-Derivate im homologen Aminoacylierungstest war ähnlich der der unmodifizierten tRNA^{Phe}. Damit war die Voraussetzung gegeben für Untersuchungen der Aktivität dieser Derivate in den Testsystemen, die empfindlich auf die Abwesenheit der Base YWye reagieren ((6); vgl. Einleitung).

4.1. Poly(U)-abhängige Bindung an Ribosomen aus Hefe

Die Testbedingungen wurden so gewählt, daß unmodifizierte tRNA^{Phe} praktisch quantitativ, tRNA^{Phe}_{-YWye} nur in geringem Umfang gebunden wurden (Abb. 22). Die Untersuchung der reinen tRNA^{Phe}-Hydrazin-Derivate ergab deutliche Unterschiede der Bindungsaktivität der einzelnen tRNAs (Abb. 23). Die höchste Aktivität wurde durch den Einbau von Hac (70%) erreicht, gefolgt von Dnph mit 60% und Hqn mit 50%. Die mit Dmh substituierte tRNA ist praktisch inaktiv und unterscheidet sich nicht von tRNA^{Phe}_{-YWye} (6%).

Versuche mit den Gemischen nicht umgesetzter tRNA^{Phe}_{-YWye} mit tRNA^{Phe}_{Dnph} zeigten, daß das Ausmaß der

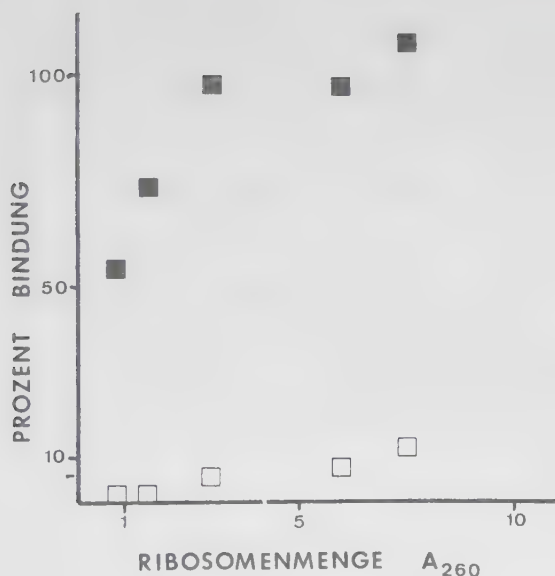


Abb. 22 Bindung von tRNA^{Phe} und tRNA^{Phe}_{-YWye} an Ribosomen aus Hefe in Abhängigkeit von der Ribosomenmenge

Der Bindungstest wurde wie in 5.15. beschrieben durchgeführt. ■ tRNA^{Phe}, □ tRNA^{Phe}_{-YWye}.

Ribosomenbindung in etwa mit dem Einbau des Hydrazinderivats korreliert war (Tab. 3).

Ergebnisse mit Gemischen von tRNA^{Phe}_{-YWye} mit tRNA^{Phe}_{Inh}, tRNA^{Phe}_{Agi}, tRNA^{Phe}_{Tsc} und tRNA^{Phe}_{Ptsc} (vgl. 3.3.5.) zeigten, daß alle Verbindungen stärker als tRNA^{Phe}_{-YWye} und tRNA^{Phe}_{Dmh} an die Ribosomen gebunden wurden (Tab. 4). Die Ergebnisse sind jedoch nur qualitativ zu werten, da in diesen Versuchen nicht die chromatographisch gereinigten tRNA^{Phe}-Derivate eingesetzt wurden.

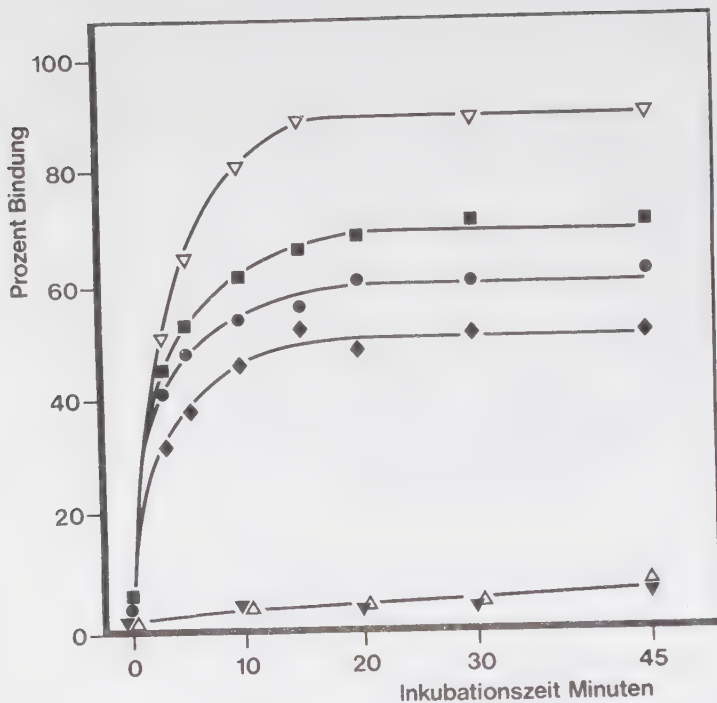


Abb.23 Poly(U)-abhängige Bindung der tRNA^{Phe}-Derivate an Ribosomen aus Hefe

Die Ribosomen aus Hefe wurden nach (39) präpariert. Der Bindungstest wurde wie in 5.15. beschrieben durchgeführt.

▽ tRNA^{Phe}, ■ tRNA^{Phe}_{Hac}, ● tRNA^{Phe}_{Dnp}, ◆ tRNA^{Phe}_{Hqn},
 ▽ tRNA^{Phe}_{Dmn}, △ tRNA^{Phe}_{-Ywy}.

Tab.3 Korrelation zwischen Substitution und Aktivität im Ribosomenbindungstest bei tRNA^{Phe}_{Dnph}

¹⁴ C-Phe-tRNA	% umgesetzt	% Bindung
tRNA ^{Phe}		98
tRNA ^{Phe} _{-YWye}	0	11
tRNA ^{Phe} _{Dnph}	24	18
"	34	31
"	41	43
"	100	60

Tab.4 Korrelation zwischen Substitution und Aktivität im Ribosomenbindungstest bei verschiedenen modifizierten tRNAs

¹⁴ C-Phe-tRNA	% Modifizierung	% Bindung
tRNA ^{Phe}		93
tRNA ^{Phe} _{-YWye}	0	21
tRNA ^{Phe} _{Inh}	40	37
tRNA ^{Phe} _{Tsc}	100	37
tRNA ^{Phe} _{Ptsc}	80	40
tRNA ^{Phe} _{Agd}	100	36
tRNA ^{Phe} _{Dmh}	100	20

4.2. Poly(U)-abhängige Bindung an Ribosomen aus E. coli

Die Abhängigkeit der Bindungsaktivität von der Anwesenheit der Base YWye in tRNA^{Phe} gilt ebenso

für Ribosomen aus *E. coli*. Die Bindungsaktivitäten von tRNA^{Phe} , $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{-\text{YWye}}$, $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf}}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Etd}}$ sind in der Literatur beschrieben (6,21,39). Die für diese tRNAs angegebenen Werte konnten reproduziert werden (Tab.5). Die unter den gleichen Bedingungen ermittelte Aktivität von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Hac}}$, $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Dnph}}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Hqn}}$ war ähnlich der von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Etd}}$ und etwas niedriger als $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf}}$ (Tab.5). Auch in diesem Test erwiesen sich $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{-\text{YWye}}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Dmh}}$ als praktisch inaktiv.

Tab.5 Poly(U)-abhängige Bindung an Ribosomen aus *E. coli* MRE 600. Der Test wurde wie in 5.17. beschrieben durchgeführt.

^{14}C -Phe-tRNA	% Bindung
tRNA^{Phe}	91
$\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{-\text{YWye}}$	15
$\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf}}$	70
$\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Etd}}$	60
$\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Hac}}$	64
$\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Dnph}}$	65
$\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Hqn}}$	59
$\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Dmh}}$	19

4.3. Aminoacylierung der tRNA^{Phe} -Derivate mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*

Die Kinetik der Aminoacylierung der reinen tRNA^{Phe} -Derivate mit heterologem Enzym ist in Abb.24

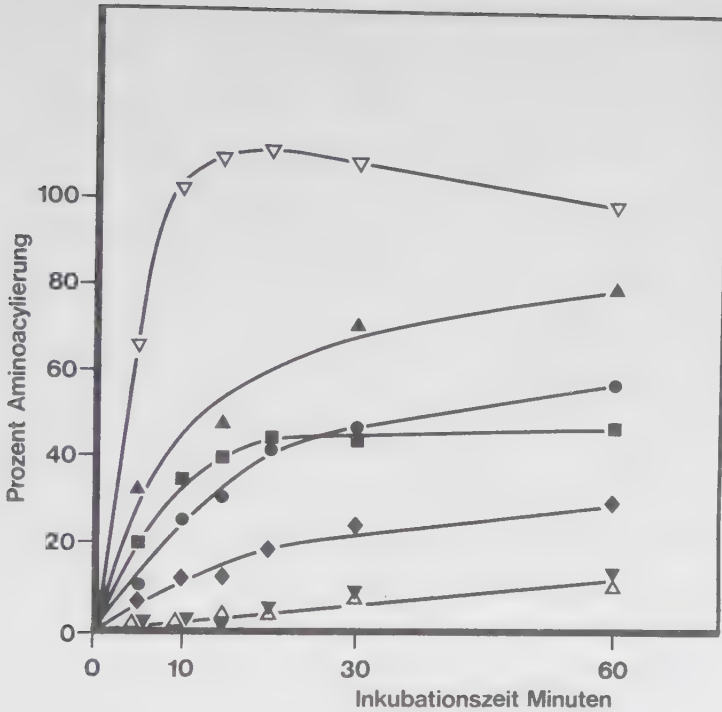


Abb.24 Kinetik der Aminoacylierung von tRNA^{Phe}-
Derivaten mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*

Die heterologe Aminoacylierung wurde wie in 5.12. beschrieben durchgeführt. Als Enzym wurde Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* K12 verwendet. Die heterologe Aminoacylierung ist relativ zur homologen Aminoacylierung (1100-1300 pMol/A₂₆₀-Einheit) angegeben.

▽ tRNA^{Phe}, ▲ tRNA^{Phe}_{Prf}, ■ tRNA^{Phe}_{Hac}, ● tRNA^{Phe}_{DnpH},
◆ tRNA^{Phe}_{Hqn}, ▼ tRNA^{Phe}_{Dmh}, △ tRNA^{Phe}_{-YWye}.

wiedergegeben. Die in diesen Untersuchungen ermittelten Akzeptoraktivitäten von tRNA^{Phe} , $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{-Ywe}}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Pri}}$ entsprechen den für diese tRNAs in der Literatur angegebenen (20,28). Die Akzeptoraktivitäten von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Inh}}$, $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Ptsc}}$, $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Tsc}}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Agd}}$ wurden deutlich höher (10-15%) als die von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{-Ywe}}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Dmh}}$ gefunden.

4.4. Diskussion

Die drei verwendeten Testsysteme, Poly(U)-abhängige Bindung an Ribosomen aus E. coli und Hefe, sowie die heterologe Aminoacylierung mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus E. coli, haben für die untersuchten tRNA^{Phe} -Hydrazin-Derivate qualitativ ähnliche Resultate erbracht. Das letztgenannte System zeigte dabei die deutlichsten Abstufungen. Der Befund, daß $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Dmh}}$ die gleiche, verschwindend geringe Aktivität wie $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{-Ywe}}$ aufweist, zeigt zweierlei: Einmal hat offenbar die Kondensation der freien Ribose mit einer Hydrazinfunktion keinen aktivitätssteigernden Einfluß, und zweitens reicht eine kleine aliphatische Gruppierung nicht aus, um die Lücke in der Nukleotidkette der Anticodon-Schleife so auszufüllen, daß die Aktivität der tRNA wiederhergestellt würde. Monozyklische Aromaten, wie sie in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Inh}}$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Ptsc}}$ als Substituenten eingeführt wurden, liefern einen, jedoch nur geringen, Aktivitätszuwachs. Zu einer deutlich erhöhten Aktivität führt erst der Einbau eines aromatischen Zweiringsystems, wie in $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Hqn}}$. Durch den

Einbau der aromatischen Dreiringsysteme Hac, Prf und Etd wurden tRNA^{Phe} -Derivate erhalten, deren Aktivität die der nativen tRNA^{Phe} nahezu erreicht. Dieser Befund zeigt, daß offenbar erst eine aromatische Gruppe vergleichbarer Größe die Base YWye in ihrer Funktion ersetzen kann. Entsprechend läßt sich die überraschend hohe Aktivität der $\text{tRNA}_{\text{Dnph}}^{\text{Phe}}$ wohl damit erklären, daß die beiden Nitrogruppen zusammen mit dem Phenylring ein konjugiertes System ähnlicher Ausdehnung darstellen. Hervorzuheben ist, daß Prf und Etd (21) und wahrscheinlich auch Hac ähnlich wie YWye (13) besonders ausgeprägte Wechselwirkungen mit den benachbarten Basen eingehen. Die mit den entsprechenden tRNA^{Phe} -Derivaten beobachtete besonders hohe Aktivität deutet darauf hin, daß derartige Wechselwirkungen der Base an der YWye-Position in der Anticodon-Schleife besonders wichtig sind. Das ist wohl der Grund dafür, daß Guanin an dieser Position, das sich nicht durch die Fähigkeit zu besonders starken Wechselwirkungen dieser Art auszeichnet, zu YWye modifiziert wird (40).

Die Tatsache, daß heterologe Systeme ähnliche Befunde liefern wie das homologe, legt nahe, daß die Base an dieser Stelle im wesentlichen die Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation der Anticodon-Schleife oder der ganzen tRNA bewirkt. Einen direkten Beweis für diese Deutung der Befunde haben NMR-Untersuchungen erbracht. Sie haben gezeigt, daß die Veränderungen des Spektrums der tRNA^{Phe} , die durch Abspaltung von YWye bewirkt werden, durch den

Einbau von Prf vollständig rückgängig gemacht wurden (41).Darüberhinaus kann man vermuten,daß die besonderen Eigenschaften der Base YWye eine Rolle spielen bei einer Codon-induzierten Konformationsumlagerung des tRNA-Moleküls,für die es eine Reihe von Hinweisen gibt (28,42).

5. Beschreibung der Versuche

5.1. Spaltung von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Anilin (23)

Ein Volumen $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ -Lösung (10-100 A_{260} -Einheiten/ml) wurde mit 2 Volumen Anilinlösung (0.45 M, mit HCl auf pH 5 eingestellt) 3h bei 37°C inkubiert. Bei präparativen Ansätzen wurde unter Stickstoff und Lichtausschluß gearbeitet. Nach Zusatz von 0.2 Volumen 50%-iger Kaliumacetatlösung wurde das Anilin mit Äther ausgeschüttelt und die tRNA mit Äthanol gefällt. Das Anilin wurde vor Gebrauch durch Vakuumdestillation über Zinkstaub in Stickstoffatmosphäre gereinigt.

5.2. Spaltung von $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ mit Aminen

In analytischen Ansätzen wurden etwa 10 A_{260} -Einheiten tRNA/ml mit Amin in 10- und 1000-fach molarem Überschuß in 0.1M Puffer inkubiert. Das Gesamtvolumen der Probe betrug 30 μl . Nach Zugabe von 10 μl Bromphenolblaulösung wurden die Proben mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5.18) analysiert.

5.3. Nachweis der Substitution der freien Ribose in $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$

Einzelschritte der Prozedur sind in der Literatur beschrieben und wurden teilweise modifiziert (21,25).

A. 0.2-0.4 A_{260} -Einheiten der mit Amin oder Hydrazinderivat umgesetzten $\text{tRNA}_{\text{-YWye}}^{\text{Phe}}$ wurden mit Äthanol

gefällt. Der getrocknete Niederschlag wurde in 20 μ l 0.4M Tris-HCl (pH 7.5) aufgenommen, mit dem gleichen Volumen einer Lösung von ^3H -NaBH₄ (20mg/ml in 0.02N KOH) versetzt und 3min bei 0°C unter Lichtabschluß inkubiert. Durch Zugabe von 6N Essigsäure wurde die Reaktionslösung auf pH 5 gebracht und die tRNA mit Äthanol gefällt.

B. Bei Umsetzungen mit Aminen wurde der getrocknete Niederschlag in 20 μ l 0.1M Natriumacetat (pH 5.3) aufgenommen, mit dem gleichen Volumen Natriumperjodatlösung (20mM) versetzt und 2h bei 0°C unter Lichtausschluß inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glykol und anschließende Fällung der Nukleinsäure mit Äthanol gestoppt.

Der getrocknete Niederschlag aus A. bzw. B. wurde in 10 μ l Wasser aufgenommen und mit dem gleichen Volumen T1-RNAase-Lösung (500 U/ml in 0.2M Tris-HCl (pH 7.5)) 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde vollständig zur Polyacrylamid-Gel-elektrophorese verwendet.

Die densitometrische Auswertung erfolgte nach 5.18.. Die Bande des Dodekanukleotids wurde in der Regel in sechs 2mm breite Streifen geschnitten, in denen die Radioaktivität bestimmt wurde (5.20.). Die Radioaktivität wird relativ zur Fläche des entsprechenden Gipfels im Densitogramm angegeben.

5.4. Kondensation von tRNA^{Phe}_{-YWye} mit Aminen (analog (21))

Die Reaktionsmischung enthielt, wenn nicht anders angegeben, 15 μ M tRNA^{Phe}_{-YWye}, 1mM Amin, 0.1M Puffer und, falls notwendig, Lösungsmittel bis maximal 30%. Inkubationstemperatur 37°C, Inkubationsdauer 30-60min. Die Aufarbeitung wurde nach 5.8. durchgeführt.

5.5. Reduktion mit NaBH₄ (analog (21))

Zur Reduktion der Schiff'schen Base wurden bis zu 100 A₂₆₀-Einheiten/ml mit 20mg/ml NaBH₄ in 0.2M Tris-HCl (pH 7.5) 15min bei 0°C unter Lichtausschluß inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde mit 6N Essigsäure auf pH 5 gebracht und die tRNA mit Äthanol gefällt. Reduzierte tRNA wurde durch wiederholte Alkoholfällungen gereinigt.

5.6. Umwandlung der freien Ribose in tRNA^{Phe}_{-YWye} in Erythrose

Die Methode folgt im Prinzip bekannten Vorschriften (29). 30 A₂₆₀-Einheiten/ml tRNA^{Phe}_{-YWye} wurden in 0.1M Natriumacetat (pH 5.3), 5mM MgCl₂ mit 25mM Natriumperjodat 60min bei 0°C unter Lichtausschluß umgesetzt. Die tRNA wurde mit Äthanol gefällt und durch zweimaliges Umfällen gereinigt. Anschließend wurde eine Anilinbehandlung (5.1.) durchgeführt. Nach dreimaliger Fällung mit Äthanol wurde die tRNA in 0.1M Tris-HCl (pH 8.5) mit Phosphatase aus Kälberdarm 15min bei 30°C inkubiert. Die Reaktions-

mischung wurde dreimal mit wassergesättigtem Phenol, fünfmal mit Äther extrahiert und die tRNA mit Äthanol gefällt. Die weitere Reinigung erfolgte durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5.18.).

5.7. Umsetzungen mit Hydrazinderivaten

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Hydrazinderivate nach folgendem Rezept mit tRNA^{Phe}_{-YWye} umgesetzt: 25 μ M tRNA wurden mit 25mM Hydrazinderivat (in HMPT) in 62.5mM Natriumacetat (pH 4) und 50% HMPT 4h unter Lichtausschluß bei 27°C inkubiert. Daran schloß sich eine Aufarbeitung nach 5.8. an.

5.8. Aufarbeitung der tRNA nach der Umsetzung mit primären Aminen oder Hydrazinderivaten (analog (21))

Die Reaktionsmischung wurde mit 1M Tris-HCl (pH 8.5) auf 0.1M Tris gebracht (cave: Konzentrationen von über 0.1M Tris-HCl führen zu Verlusten an tRNA in der Phenolphase!) und viermal mit wassergesättigtem Phenol und fünfmal mit Äther extrahiert. Nach der Zugabe von 1M Kaliumacetat (pH 6) zu der Endkonzentration von 0.15M wurde die tRNA mit Äthanol gefällt. Die Reinigung erfolgte durch mehrmaliges Umfällen.

5.9. Spaltung mit T1-RNAase

30-50 A₂₆₀-Einheiten tRNA/ml wurden mit 500U T1-RNAase/ml in 0.1M Tris-HCl (pH 7.5) eine Stunde bei

25°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde 7M an Harnstoff gemacht und über eine DEAE-Cellulosesäule chromatographisch aufgetrennt (5.10.)

5.10. Chromatographie von T1-RNAase-Hydrolysaten

Das Spaltungsgemisch (5.9.) wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (0.4x80cm) aufgetragen und bei Raumtemperatur und einem Druck von 25at mit einem Gradienten von je 250ml 0.01 und 0.03M NaCl in 10mM Tris-HCl (pH 7.5) und 7M Harnstoff eluiert.

5.11. Aminoacylierung von tRNA^{Phe} und tRNA^{Phe}-Derivaten mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe

Die Prozedur ist in (43) beschrieben. In dem Inkubationsgemisch von 0.1ml waren 0.03-0.05 A₂₆₀-Einheiten tRNA, 0.2 A₂₈₀-Einheiten der rohen Synthetasefraktion oder 80-100 μ Einheiten (44) Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, 1 μ Mol ATP, 2 μ Mol MgCl₂, 2.5 μ Mol Tris-HCl (pH 7.5) und 5nMol L-(¹⁴C) Phenylalanin enthalten. Wenn nicht anders angegeben, wurde 15min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von kalter 5%-iger Trichloressigsäure wurde das Gemisch über Glasfilter filtriert. Die Filter wurden zweimal mit Trichloressigsäure und einmal mit Äthanol gewaschen und 30min bei 80°C getrocknet. Die Radioaktivität auf den Filtern wurde in 5ml Szintillationsgemisch gemessen.

5.12. Aminoacylierung mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*

Die Prozedur ist in (20) beschrieben. Die Durchführung erfolgte wie in 5.11. beschrieben, jedoch in Anwesenheit von 1.2M Ammoniumsulfat in der Inkubationsmischung.

5.13. Präparation von Ribosomen aus Hefe

Die Prozedur wurde wie in (39) beschrieben durchgeführt.

5.14. Poly(U)-abhängige Bindung an Ribosomen aus Hefe

Die Methode folgt im Prinzip den in (39) gegebenen Vorschriften. Zu dem in 5.11. beschriebenen Testansatz, der 20min bei 25°C inkubiert worden war, wurden etwa 3 A₂₆₀-Einheiten Ribosomen zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe entsprechender Lösungen auf die Konzentrationen des Bindungstests (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 20mM Magnesiumacetat, 140mM Ammoniumchlorid und 1mM Dithiothreitol) gebracht und weitere 20min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.8 A₂₆₀-Einheiten Poly(U) wurde die Inkubation noch 20min fortgesetzt. Die Reaktion wurde gestoppt durch Verdünnen mit eiskaltem Puffer und die Reaktionsmischung langsam über Millipore-Filter abgesaugt. Die eingesetzte Menge an aminoacylierter tRNA wurde durch Fällern eines analog, aber ohne Poly(U)-

Zugabe, durchgeführten Ansatzes mit eiskalter Trichlor-essigsäure ermittelt. Die Kontrollwerte ohne Poly(U)-Zugabe wurden von den Ergebnissen mit Poly(U) jeweils abgezogen.

5.15. Präparation von Ribosomen aus *E. coli* MRE600

Die Isolierung folgte im Prinzip bekannten Vorschriften (45-48). 20g gefrorene Zellen (*E. coli* MRE 600) wurden mit 40g Aluminiumoxid (Alcoa) etwa 5min verrieben und mit Standardpuffer (150ml) (0.01M Tris-Acetat (pH 7.6), 0.01M Magnesiumacetat, 0.06M KCl, 5mM β -Mercaptoäthanol) und 0.3mg DNAase versetzt. Das Aluminiumoxid und grobe Zellbestandteile wurden durch Zentrifugieren (2x20min 20000g) entfernt. Aus dem Überstand wurden die Ribosomen bei 105 000g in 90min abzentrifugiert. Der Überstand (S 100) wurde dialysiert. Die Ribosomen wurden zweimal mit 3M KCl, 0.04M Magnesiumacetat, 5mM β -Mercaptoäthanol, 0.01M Tris (pH 7.6) und dreimal mit Standardpuffer gewaschen. Durch Überschichten mit Puffer und gelegentlichem Umschwenken wurden die Ribosomen resuspendiert. Die nach der Resuspension unlöslichen (denaturierten) Proteine wurden jeweils durch Zentrifugieren bei 20000g entfernt. Die Aufarbeitung wurde bei 0°-4°C durchgeführt.

5.16. Poly(U)-abhängige Bindung an Ribosomen aus *E. coli*

Das System war ähnlich dem von (49). Das Inkuba-

tionsgemisch enthielt in 0.1ml etwa 0.02 A_{260} -Einheiten (^{14}C)-Phe-tRNA^{Phe} bzw. Phe-tRNA^{Phe}-Derivat, 4 A_{260} -Einheiten Ribosomen, 0.75 A_{260} -Einheiten Poly(U), 0.1M Tris-Acetat (pH 7.2), 0.02M Magnesiumacetat und 0.04M KCl. Nach 20min Inkubation bei Raumtemperatur wurde weiterverfahren wie unter 5.14..

5.17. Chromatographie über RPC-5-Säulen

Das Adsorbens wurde nach (50) vorbereitet und in eine 0.3x50cm Säule gebracht. Die Elution erfolgte über einen Gradienten 0.35 und 0.70M NaCl in 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂ (je 200ml) bei Raumtemperatur mit einem Druck von 25-40at. Die tRNA-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und die tRNA mit Äthanol gefällt. Nach viermaligem Umfällen mit Äthanol wurde die tRNA in die Versuche eingesetzt.

5.18. Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen

Die Prozedur ist ausführlich in (51) beschrieben. Analytische Trennungen von tRNA-Fragmenten wurden in Trenngelen, Schichtdicke 3mm, aus 16% Acrylamid und 1.3% N,N'-Methylenbisacrylamid in 7M Harnstoff ausgeführt. Das Puffersystem enthielt Tris/Veronal (pH 8.9). 0.05-0.2 A_{260} -Einheiten (10-25 μ l) wurden mit dem gleichen Volumen einer 0.005%-igen Lösung von Bromphenolblau in 7M Harnstoff, 50% Saccharose versetzt und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Laufzeit betrug etwa 6h bei Raumtemperatur und 350V. Nach der Trennung wurden die Nukleinsäurebanden mit "all-stain"-

Farbstoff sichtbar gemacht.

Präparativ wurden die tRNAs in 1cm dicken Trenngelen aus 11% Acrylamid und 0.5% N,N'-Methylenbisacrylamid im gleichen Puffersystem aufgetrennt. Nach kurzem Anfärben mit Toluidinblau wurden die angefärbten Gelzonen ausgeschnitten, eingefroren und zerkleinert. Fünfmalige Extraktion mit 0.5M NaCl und eine darauf folgende kurze Dialyse lieferte eine Lösung, die über DEAE-Cellulose chromatographiert wurde. Die tRNA wurde anschließend mit Äthanol gefällt, in 0.1M Natriumacetat (pH 5) aufgenommen, dreimal mit wassergesättigtem Phenol, dreimal mit Äther extrahiert und nochmals mit Äthanol gefällt.

Die densitometrische Auswertung der analytischen Geltrennungen wurden nach dem Entfärben des Untergrunds mit einer Tageslichtlampe durch Messung der Extinktion bei 546nm durchgeführt. Innerhalb bestimmter Konzentrationsbereiche ist bei Einhaltung der Färbe- und Entfärbedingungen die Extinktion, d.h. die Fläche eines Gipfels im Densitogramm, in dem in der vorliegenden Arbeit vorkommenden Kettenlängenbereich der Nukleinsäuren proportional der Nukleotidmenge. Quantitative Angaben sind nur relativ zu anderen Banden desselben Gelstreifens möglich. Die Menge eines Fragments wird deshalb immer auf die Gesamtfläche aller Gipfel des Densitogramms bezogen angegeben.

5.19. Radioaktivitätsmessungen

Radioaktivität auf Filtern wurde in Toluolszintillator (4g Omnifluor in 1l dest. Toluol) gemessen. Zur Bestimmung der Radioaktivität in Polyacrylamid-Gelen wurden die Gelstreifen in 2mm breite Scheiben zerschnitten, verbrannt und in Szintillationsgemisch aufgenommen.

5.20. Apparative Hilfsmittel

Für Absorptionsmessungen wurden Spektralphotometer PMQ II und PL 4 der Fa. Zeiss verwendet. Fluoreszenz wurde mit einem Hitachi MPF-2A Fluoreszenzspektrometer (Perkin-Elmer) gemessen. Für die Szintillationsmessung dienten die Tri-Carb Modelle 3310 und 3375 (Packard Instruments). Für die Disk-Elektrophorese wurde die Elektrophoresekammer EC 490 (EC Apparatus Corp.) verwendet. Für pH-Messungen wurden pH-Meter der Fa. Radiometer, Kopenhagen, benutzt. Gelstücke wurden mit dem Ultraturrax TP 18/2 (Jahnke und Kunkel, Staufen) zerkleinert. Gelstücke wurden zur Radioaktivitätsbestimmung in einem Oximat (Intertechnique) verbrannt und in Szintillationsmischung aufgenommen. Zur Säulenchromatographie wurde die Hochdruckpumpe Lebotron HKP 50 eingesetzt.

5.21. Materialien

5.21.1. tRNAs

tRNA^{Phe} wurde wie in (52) beschrieben, aus Brau-

ereihefe-tRNA (Boehringer, Mannheim) isoliert, Akzeptoraktivität 1100-1400 pMol Phe/A₂₆₀-Einheit, tRNA^{Ser} von H.G.Zachau und S.Notz nach (53). tRNA^{Phe}_{-YWye} wurde wie in (6) hergestellt, Akzeptoraktivität 900-1300 pMol Phe/A₂₆₀-Einheit.

5.21.2. Enzyme

Das rohe Gemisch der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (EC.6.1.1.) und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (EC.6.1.1.16.) mit der spezifischen Aktivität von 2-3 Einheiten/A₂₈₀-Einheit aus Brauereihefe wurden von U.Pachmann und G.Kwiatkowski hergestellt (44).

Eine rohe Fraktion der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus E.coli wurde von J.M.Robertson zur Verfügung gestellt. Reine Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus E. coli war von A.Böck isoliert.

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (EC.3.1.3.1.) und T1-RNAase (EC.2.7.7.26.) wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen. Bei der Verwendung wurden die Aktivitätsangaben des Herstellers zugrundegelegt.

5.21.3. Reagentien

¹⁴C-Phenylalanin mit verschiedenen spezifischen Radioaktivitäten wurde von The Radiochemical Centre, Amersham, bezogen; ³H-NaBH₄ verschiedener spezifischer Radioaktivitäten, ¹⁴C-Methylamin-HCl (8.93 mG/mMol) und Omnifluor von der New England Nuclear Corp., Boston.

Die Substanzen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin, Veronal, Bromphenolblau und Toluidinblau stammten von Serva, Heidelberg. Von derselben Firma wurde auch Ethidiumbromid sowie die Materialien für RPC-5: Plascon 2300 und Adogen 464 bezogen.

Der Trimethinfarbstoff 1-Äthyl-2-(3-(1-äthyl-naphtho(1,2d)thiazolin-2-yliden)-2-methyl-propenyl)-naphtho(1,2d)thiazoliumbromid ("all-stain"-Farbstoff) zum Anfärben von Gelen war ein Produkt der Eastman-Kodak Co., Rochester, wie auch 9-Hydrazinoacridin und 3-Hydrazinochinolin. Proflavinsulfat lieferte Fluka A.G., Buchs. Poly(U) und BD-Cellulose stammten von Boehringer, Mannheim. DE 52 wurde von Whatman, Maidstone, geliefert. Alle anderen Reagentien stammten von E. Merck, Darmstadt.

6. Zusammenfassung

Die Base YWye neben dem Anticodon der tRNA^{Phe} aus Hefe läßt sich selektiv abspalten, wobei der Riboseanteil des Nukleosids, dessen Aldehydgruppe nun frei ist, in der tRNA^{Phe}_{-YWye} verbleibt. Die heteroaromatischen primären Amine Proflavin und Ethidium ließen sich mit dieser Aldehydgruppe in guter Ausbeute kondensieren.

Von diesen Befunden ausgehend, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst versucht, Kondensationsprodukte der tRNA^{Phe}_{-YWye} mit anderen primären Aminen herzustellen. Nach der Entwicklung einer allgemein anwendbaren Nachweis- und Bestimmungsmethode wurde eine Reihe von primären Aminen, davon besonders eingehend Methylamin, Anilin und 3-Aminopyren, untersucht. Dabei zeigte sich, daß primäre Amine im allgemeinen für die Herstellung stabiler Kondensationsprodukte mit der tRNA^{Phe}_{-YWye} nicht geeignet sind. Besonders bei homocyclischen aromatischen Aminen sowie bei vielen aliphatischen Aminen machte die schon früher beschriebene Spaltung der tRNA^{Phe}_{-YWye} durch Amin-katalysierte β -Eliminierung oder die geringe Stabilität der Kondensationsprodukte die Isolierung von tRNA^{Phe}-Amin-Derivaten unmöglich.

Umsetzungen mit Hydrazinderivaten führten in den meisten Fällen zu spezifisch modifizierten tRNA^{Phe}-Derivaten. Die Kondensationsprodukte der tRNA^{Phe}_{-YWye} mit Dimethylhydrazin, Aminoguanidin, Thiosemicarbamid, 4-Phe-nylthiosemicarbamid, Isonikotinsäurehydrazid, 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 3-Hydrazinochinolin und 9-Hydrazinoacridin konnten in guten Ausbeuten hergestellt

und in den meisten Fällen chromatographisch rein isoliert werden. Bei zwei ausgewählten tRNA^{Phe} -Hydrazin-Derivaten wurde durch die Analyse der durch Spaltung mit T1-RNAase erhaltenen Oligonukleotide nachgewiesen, daß die Hydrezinsubstitution nur an der freien Ribose der $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{-YWye}}$ stattgefunden hatte.

Die Aktivität der tRNA^{Phe} -Derivate wurde in biochemischen Testsystemen untersucht. Alle tRNA^{Phe} -Derivate waren mit der homologen Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe gut aminoacylierbar. Die Aminoacylierbarkeit durch Synthetase aus *E. coli* zeigte deutliche Unterschiede der Aktivität der einzelnen tRNA^{Phe} -Derivate. Hohe Aktivität (bis zu 80% der Aktivität von nativer tRNA^{Phe}) wurde durch den Einbau von tricyclischen heteroaromatischen Systemen erreicht, während bi- und monocyclische Substituenten in der tRNA nur zu mittleren bis schlechten Aktivitäten führten. Die mit Dimethylhydrazin substituierte tRNA^{Phe} war in diesem Test, wie die $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{-YWye}}$, praktisch inaktiv. Vergleichbare Resultate lieferte die Untersuchung der Poly(U)-abhängigen Bindung der tRNA^{Phe} -Derivate an Ribosomen aus Hefe und *E. coli*.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß die Anwesenheit einer Gruppe neben dem Anticodon der tRNA^{Phe} , die nur die von der Base YWye hinterlassene Lücke ausfüllt, nicht ausreicht, um die native Konformation der tRNA^{Phe} aufrecht zu erhalten. Offenbar ist dazu ein ausgedehntes aromatisches System notwendig, das zu starken hydrophoben Wechselwirkungen mit den benach-

barten Basen befähigt ist. Die Base Ywe in tRNA^{Phe} ist demnach wegen der starken Wechselwirkungen, die sie mit den benachbarten Adeninbasen eingeht, vorteilhaft für die Funktion dieser tRNA in der Proteinbiosynthese. Ihre Funktion ist wahrscheinlich die Stabilisierung einer bestimmten Konformation der Anticodon-Schleife, die die Codon-Anticodon-Wechselwirkung ermöglicht oder begünstigt.

7. Literaturverzeichnis

1. Rich, A. und RajBhandary, U.L. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 805-860
2. Ladner, J.E., Jack, A., Robertus, J.D., Brown, R.S., Rhodes, D., Clark, B.F.C. und Klug, A. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 4414-4418
3. Quigley, G.J., Wang, A.H.J., Seeman, N.C., Suddath, F.L., Rich, A., Sussmann, J.L. und Kim, S.H. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 4866-4870
4. Nishimura, S. (1972) *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 12, 50-85
5. Fittler, F. und Hall, R.H. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 441-446
6. Thiebe, R. und Zachau, H.G. (1968) *Eur. J. Biochem.* 5, 546-555
7. Gefter, M.L. und Russel, R.L. (1969) *J. Mol. Biol.* 39, 145-157
8. Faulkner, R.D. und Uziel, M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 238, 464-474
9. Miller, J.P., Hussein, Z. und Schweizer, M.P. (1976) *Nucl. Acid Res.* 3, 1185-1199
10. Hirsch, R. und Zachau, H.G. (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 563-566
11. Grunberger, D., Weinstein, I.B. und Mushinski, J.F. (1975) *Nature* 253, 66-67
12. Beardsley, K., Tao, T. und Cantor, C.R. (1970) *Biochemistry* 9, 3524-3532
13. Faelicke, A., v.d. Hear, F., Sprinzl, M. und Cramer, F. (1975) *Biopolymers* 14, 155-171

14. Kan, L.S., Ts'o, P.O.P., v.d.Haar, F., Sprinzl, M. und Cramer, F. (1975) Biochemistry 14, 3278-3291
15. Igo-Kemenes, T. und Zachau, H.G. (1969) Eur. J. Biochem. 10, 549-556
16. Yoshikami, D. und Keller, E.B. (1971) Biochemistry 10, 2969-2976
17. Kasei, H., Goto, M., Takemura, S., Goto, T. und Matsuura, S. (1971) Tetrahedron Lett. 29, 2725-2728
18. Nakanishi, K., Furutachi, N., Funamizu, M., Grunberger, D. und Weinstein, I.B. (1970) J. Am. Chem. Soc. 92, 7617-7619
19. RajBhandary, U.L., Chang, S.H., Stuart, A., Faulkner, R.D., Hoskinson, R.M. und Khorana, H.G. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 51, 751-758
20. Thiebe, R. und Zachau, H.G. (1970) Biochim. Biophys. Acta 217, 294-304
21. Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1971) FEBS-Letters 18, 214-218 und (1974) in Methods in Enzymology XXIX, Herausgeber Grossman, L. und Moldave, K., Academic Press, New York, Seite 667-673
22. Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1975) Molekularnaya Biologiya (Moskau) 9, 63-69; Mol. Biol. 9, 49-53
23. Wintermeyer, W., Thiebe, R. und Zachau, H.G. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1625-1632
24. Turchinskii, M.F., Gus'kova, L.I., Khazai, I., Budovskii, E.I. und Kochetkov, N.K. (1970) Molekularnaya Biologiya (Moskau) 4, 428-434
25. Freacker-Gonnert, H. und Steinschneider, A. (1968) in Methods in Enzymology XIIB, Herausgeber Grossmann, L. und Moldave, K., Academic Press, New York, Seite 243-246.

26. Churchich, J.E. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 75, 274-276
27. Beardsley, V. und Cantor, C.R. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 65, 39-46
28. Wintermeyer, W., Robertson, J.W. und Zachau, H.G. (1976) in *Proceedings of the International Conference "Synthesis, Structure and Chemistry of Transfer Ribonucleic Acids and Their Components"*, Herausgeber Wiewiórowski, M., Poznań, Polen, Seite 306-319
29. Wintermeyer, W. (1972) *Dissertation, Universität München*
30. *Handbook of Chemistry and Physics*, 52. Ausgabe 1972, Herausgeber Weast, R.C., The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio
31. Perrin, D.D. (1965) *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, Butterworths, London
32. Schleich, H.G. (1973) *Diplomarbeit, Universität Heidelberg*
33. Gillam, I., Millward, S., Blew, D., v. Tigerstrom, M., Wimmer, E. und Tener, G.M. (1967) *Biochemistry* 6, 3043-3065
34. Odom, O.W., Hardesty, B., Gorse, Jr., R.A. und White, J.M. (1976) in *Proceedings of the Second International Symposium on Ribosomes and Nucleic Acid Metabolism*, Herausgeber Zelinka, J. und Balan, J., Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Seite 301-317
35. Freist, W., Häselicke, A., Sprinzl, N. und Cramer, F. (1972) *Ann. J. Biochem.* 31, 215-220

36. Reines, S.A. und Cantor, C.R. (1974) Nucl. Acid Res. 1, 767-786
37. Nulu, J.R. und Nematollahi, J. (1969) Tetrahedron Lett. 17, 1321-1324
38. Albert, A. (1966) in "The Acridines", Arnold, London, Seite 195
39. Robertson, J.M., Kahan, M., Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 117-125
40. Thiebe, R. und Poralla, K. (1973) FEBS-Letters 38, 27-28
41. Wong, K.L., Kearns, D.R., Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1975) Biochem. Biophys. Acta 395, 1-4
42. Schwarz, U., Menzel, H.M. und Gassen, H.G. (1976) Biochemistry 15, 2484-2490
43. Zachau, H.G. (1970) in Methoden der Enzymatischen Analyse, Herausgeber Bergmeyer, H.U., Band II, Verlag Chemie, Weinheim, Seite 1828-1829
44. Hirsch, R. und Zachau, H.G. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 509-526
45. Sueoka, N. und Yamane, T. (1962) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1454-1457
46. Lengyel, P., Speyer, J.F. und Ochoa, S. (1961) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 47, 1936-1940
47. Matthaei, J.H. und Nirenberg, M.W. (1961) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 47, 1580-1582
48. Gottschling, H. und Zachau, H.G. (1965) Biochem. Biophys. Acta 103, 418-425
49. Leder, P. und Nirenberg, M.W. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52, 420-423 und 1521-1523

50. Pearson, R.D., Weiss, J.W. und Kelmers, A.D. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 228, 770-774
51. Philippsen, P. und Zachau, H.G. (1972) Biochim. Biophys.
Acta 277, 524-536
52. Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1975) FEBS-Letters
58, 306-309
53. Zachau, H.G., Dütting, D. und Feldmann, V. (1966)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 347, 212-267
54. Eur. J. Biochem. (1970) 15, 203 und (1971) 18, 588
55. Cohn, W.E. (1975), Rundschreiben des National Research
Council, Office of Biochemical Nomenclature, Washing-
ton, D.C.

Verzeichnis der Abkürzungen

A ₂₆₀	Extinktion bei 260nm und 1cm Lichtweg
Apn	3-Aminopyren
Agd	Aminoguanidin
BD-Cellulose	benzoylierte DEAE-Cellulose
DEAE	Diäthylaminoäthyl
Dmh	1,1-Dimethylhydrazin
Dnph	2,4-Dinitrophenylhydrazin
Etd	Ethidium(bromid)
Hac	9-Hydrazinoacridin
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
Hqn	3-Hydrazinochinolin
Inh	Isonikotinsäurehydrazid
Prf	Proflavin
Ptsc	4-Phenylthiosemicarbazid
RNAase	Ribonuklease
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA ^{Phe}	phenylalaninspezifische Transfer- Ribonukleinsäure aus Hefe
tRNA ^{Phe} _{Hac}	tRNA ^{Phe} , die anstelle YWye Hac trägt
tRNA ^{Phe} _{-YWye}	tRNA ^{Phe} nach Abspaltung von YWye (s.u.)
tRNA ^{Phe} _{-YWye} oxi	tRNA ^{Phe} _{-YWye} , bei der das C1 der Ribose 37 abgespalten ist
tRNA ^{Phe} _{-YWye} red	reduzierte tRNA ^{Phe} _{-YWye}
Tsc	Thiosemicarbazid

Die Bezeichnung und Abkürzung des modifizierten Nukleosids neben dem 3'-Ende des Anticodons der tRNA^{Phe} folgt einem Vorschlag von W.E.Cohn (55).

W	Wyosin, seltenes Nukleosid neben dem 3'-Ende des Anticodons der tRNA ^{Phe} aus <i>Torulopsis utilis</i>
Wye	Wye, Basenanteil des Nukleosids Wyosin
yW	Wybutosin, seltenes Nukleosid neben dem 3'-Ende des Anticodons der tRNA ^{Phe} aus Hefe (Abb. 2)
YWye	Wybutin, Basenanteil des Nukleosids Wybutosin
o ₂ yW	Wybutoxosin, seltenes Nukleosid neben dem 3'-Ende des Anticodons der tRNA ^{Phe} aus Weizen, Rattenleber
O ₂ YWye	Wybutoxin, Basenanteil des Nukleosids Wybutoxosin.

Die Abkürzungen der anderen Nukleoside folgen den Regeln der IUPAC-IUB (54).

Lebenslauf

Als Kind des Architekten Dipl.Ing. Konrad Schleich und seiner Ehefrau Annelies Schleich wurde ich am 7.August 1942 in Heidelberg geboren.Dort besuchte ich die Volksschule und von 1952 bis 1961 das humanistische Kurfürst Friedrich Gymnasium.Im Sommersemester 1961 begann ich das Chemiestudium an der Universität Heidelberg und legte dort 1971 das mündliche Hauptdiplomexamen ab.Nach Beendigung der Diplomarbeit,die ich am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München durchführte,erhielt ich 1973 das Diplom.

